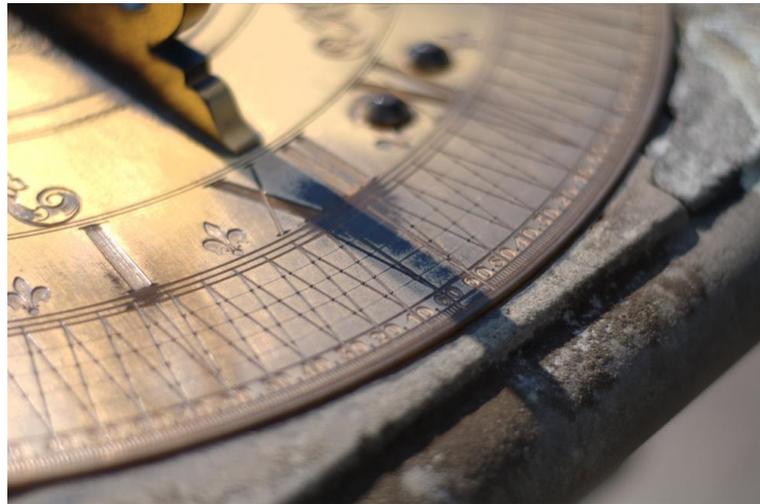


# **Resonanz-Ramanspektroskopie an Carotinoiden in Algen zur Bestimmung der Kinetik des Violaxanthinzyklus**



Von der Fakultät für Mathematik und Physik  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation von

**Dipl.-Phys. Matthias Koch**

2018

Referent: Prof. Dr. Bernhard Roth  
Hannoversches Zentrum für optische Technologien,  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferent: Prof. Dr. Uwe Morgner  
Institut für Quantenoptik,  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 22. August 2018



# Zusammenfassung

Diese Arbeit beschreibt die erste gelungene Bestimmung der Kinetik des Violaxanthinzyklus *in vivo* auf Basis von Resonanz-Ramanspektroskopie.

Der Violaxanthinzyklus ist ein Regelmechanismus der Photosynthese und besteht aus zwei Farbstoffen, Violaxanthin und Zeaxanthin, die über den Zwischenschritt Antheraxanthin ineinander umgewandelt werden können. Während Violaxanthin beim Sammeln von Sonnenlicht hilft und die absorbierte Energie ans Chlorophyll weitergibt, strahlt Zeaxanthin überschüssige Energie aus dem Chlorophyll als Wärme ab. Durch Umwandlung von Violaxanthin in Zeaxanthin und umgekehrt können Pflanzen das Verhältnis von gesammelter und wieder abgestrahlter Lichtenergie einstellen und somit die Effizienz ihrer Photosynthese regeln und sich vor Stress durch zu viel Licht schützen. Wie der Violaxanthinzyklus funktioniert, wurde bislang durch die chemische Untersuchung abgeschnittener und schnell eingefrorener Blätter untersucht. Wie schnell die Pflanzen auf wechselnde Lichtverhältnisse reagieren, ließ sich mit den chemischen Verfahren jedoch nur sehr schwer und unter großem Aufwand bestimmen.

In dieser Arbeit ist durch Kombination von Resonanz-Ramanspektroskopie mit Hauptkomponentenzerlegung und einem insbesondere für die Verwendung an stark fluoreszierenden biologischen Proben neu entwickelten Grundlinienkorrekturalgorithmus die Beobachtung der Umwandlung von Violaxanthin in Zeaxanthin und zurück *in vivo* gelungen. Experimente zur Bestimmung der Kinetik beim abrupten Wechsel von Dunkel nach Hell und von Hell nach Dunkel wurden an der Grünalge *Dunaliella salina* durchgeführt. Die Zeitkonstanten für den Hell-Dunkel-Übergang liegen dabei je nach experimentellen Bedingungen zwischen  $39 \pm 8$  und  $46 \pm 4$  Minuten. Für den Dunkel-Hell-Übergang wurde eine Zeitkonstante von  $3,2 \pm 1,0$  Minuten bestimmt.

Außerdem wurden die Resonanzprofile von *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis* und *Porphyridium purpureum* in verschiedenen Stresszuständen bestimmt und in Bezug auf den Violaxanthinzyklus und die Produktion sekundärer Carotinoide diskutiert. Die Entwicklung eines Algenreaktors nach dem Airlift-Prinzip vervollständigt diese Arbeit.

**Schlagerworte:** Violaxanthinzyklus, Kinetik, Ramanspektroskopie



# Abstract

This thesis describes the first *in vivo* approach to directly measure the kinetics of the violaxanthin cycle using resonance Raman spectroscopy.

The violaxanthin cycle is a regulation mechanism within photosynthesis, consisting of two dyes, violaxanthin and zeaxanthin, which can be converted into each other via the intermediate step antheraxanthin. Violaxanthin assists the collection of sunlight and transfers absorbed energy to chlorophyll, whereas zeaxanthin radiates away excess energy from chlorophyll as heat. Plants adjust the ratio of absorbed to emitted light energy by converting violaxanthin into zeaxanthin and vice versa, changing their photosynthetic efficiency and protecting themselves from stress due to excessive light. Until now, operation of the violaxanthin cycle was studied mostly through chemical analysis of cut and quickly frozen leaves. Studying the kinetics of the reaction to varying light, however, poses a difficult experimental challenge when using chemical tools.

In this work, by combining resonance Raman spectroscopy with principal component analysis and a newly developed algorithm for baseline correction specifically tailored for highly fluorescent biological samples, observation of the conversion of violaxanthin into zeaxanthin and vice versa *in vivo* was successful. Experiments on the green alga *Dunaliella salina* were performed, featuring both the light-to-dark and the dark-to-light transition response of the algae. Time constants for the light-to-dark transition between  $39 \pm 8$  and  $46 \pm 4$  minutes depending on experimental conditions were found. The time constant determined for the dark-to-light transition is  $3,2 \pm 1,0$  minutes.

Additionally, Raman resonance profiles were determined for three common species of algae, *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, and *Porphyridium purpureum*. These were discussed in connection with the violaxanthin cycle and synthesis of secondary carotenoids. The development of a custom airlift type bioreactor completes this work.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>3</b>
<b>Abstract</b>	<b>5</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>11</b>
<b>2 Biologische Grundlagen</b>	<b>15</b>
<b>3 Streuung und Fluoreszenz</b>	<b>19</b>
<b>4 Hauptkomponentenzerlegung</b>	<b>23</b>
<b>5 Experimenteller Aufbau für die Ramanmessung</b>	<b>27</b>
<b>6 Grundlinienkorrektur</b>	<b>35</b>
6.1 Einleitung . . . . .	35
6.2 Iterative morphologische Grundlinienkorrektur . . . . .	38
6.3 Referenzmessungen zur Demonstration . . . . .	41
6.4 Korrigierte Spektren . . . . .	43
6.5 Bestimmung der nötigen Anzahl von Iterationsschritten . . . . .	44

6.6	Mögliche Artefakte des beschriebenen Algorithmus . . . . .	46
6.7	Vergleich mit anderen Grundlinienkorrekturalgorithmen . . . . .	47
6.8	Anwendung der Grundlinienkorrektur auf <i>in vivo</i> Ramanspektren . . . . .	50
<b>7</b>	<b>Algenarten, Kulturbedingungen und Entwicklung eines Bioreaktors</b>	<b>53</b>
7.1	Verwendete Algenarten . . . . .	53
7.2	<i>Chlorella vulgaris</i> . . . . .	53
7.3	<i>Haematococcus pluvialis</i> . . . . .	54
7.4	<i>Dunaliella salina</i> . . . . .	56
7.5	<i>Porphyridium purpureum</i> . . . . .	56
7.6	Kulturbedingungen und Entwicklung eines Bioreaktors . . . . .	56
<b>8</b>	<b>Grundlagen der Laserspektroskopie an Algen</b>	<b>63</b>
<b>9</b>	<b>Eine Einführung in die Erstellung von Resonanzkarten</b>	<b>75</b>
<b>10</b>	<b>Resonanzprofile</b>	<b>81</b>
10.1	Experimentelle Vorbereitung . . . . .	81
10.2	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	82
10.2.1	<i>Chlorella vulgaris</i> . . . . .	83
10.2.2	<i>Haematococcus pluvialis</i> . . . . .	85
10.2.3	<i>Porphyridium purpureum</i> . . . . .	87
10.3	Zusammenfassung . . . . .	89

<b>11 Kinetik des Violaxanthinzyklus von <i>Dunaliella salina</i></b>	<b>91</b>
11.1 Experimentelles . . . . .	91
11.2 Einblick in den Violaxanthinzyklus mittels Hauptkomponentenzerlegung .	93
11.3 Kinetik der Hell-Dunkel-Adaption . . . . .	95
11.4 Kinetik der Dunkel-Hell-Adaption . . . . .	97
11.5 Zusammenfassung . . . . .	98
<b>12 Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>101</b>
<b>A Anhang</b>	<b>103</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>107</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>115</b>
<b>Publikationen</b>	<b>117</b>
<b>Danksagung</b>	<b>119</b>



# Kapitel 1

## Einleitung

In dieser Dissertation wird der erste direkte experimentelle Zugang zur Kinetik des Violaxanthinzyklus *in vivo* auf der Basis von Resonanz-Ramanspektroskopie beschrieben und mit Experimenten an Algenkulturen erprobt. Grundsätzlich geht es darum, einen Mechanismus im Detail zu untersuchen, mit dem Pflanzen sich vor zu viel Licht schützen und ihre Photosyntheseeffizienz variieren können<sup>1</sup>.

Sehr kurzfristig können Pflanzen überschüssige, vom Blattgrün gesammelte Lichtenergie als dunkelrotes Licht wieder abstrahlen<sup>2,3</sup>. Dies lässt sich mit einem passenden Filter fotografieren, der den Wellenlängenbereich der sogenannten Chlorophyllfluoreszenz durchlässt und einen Großteil des sichtbaren Lichts absorbiert<sup>4</sup> (Abb. 1.1). Das menschliche Auge hat nur eine geringe Empfindlichkeit für dunkelrotes Licht<sup>5</sup>, weswegen die Chlorophyllfluoreszenz in der Natur normalerweise nicht auffällt. Direkt zu beobachten ist die Chlorophyllfluoreszenz jedoch an Algenkulturen, bei denen je nach Stresszustand ein Großteil des aufgenommenen Lichts als Chlorophyllfluoreszenz wieder abgestrahlt wird (Abb. 7.8).

Zusätzlich besitzen Pflanzen den Violaxanthinzyklus, welcher aus zwei Farbstoffen besteht, die von den Pflanzen ineinander umgewandelt werden können. Der eine Farbstoff, Violaxanthin, hilft mit, Licht zu sammeln, während der andere, Zeaxanthin, es der Pflanze erlaubt, gesammeltes Licht als Wärme wieder abzustrahlen. Je nach Mischungsverhältnis können die Pflanzen mit diesem Mechanismus einstellen, wie viel von dem einfallenden Licht für die Photosynthese verwendet werden soll<sup>1</sup>. Wie der Violaxanthinzyklus funktioniert, wurde bislang durch die chemische Untersuchung abgeschnittener und anschließend schnell eingefrorener Blätter untersucht. Wie schnell die Pflanzen auf wechselnde Lichtverhältnisse reagieren, ließ sich mit den chemischen Verfahren jedoch nur sehr schwer und unter großem Aufwand bestimmen<sup>6,7</sup>.

Durch den zunehmenden Klimawandel sind Stressreaktionen der Pflanzen insbesondere für die Pflanzenzüchtung hochinteressant<sup>8</sup>. Ebenso ist es in unseren gemäßigten Breiten



**Abbildung 1.1:** Chlorophyllfluoreszenz von Bambus (*Phyllostachys bissetii*), an einem wolkenlosen Sommertag mit einem 665 nm Tiefpassfilter und einer infrarotempfindlichen Kamera fotografiert. Es handelt sich nicht um ein klassisches Schwarz-Weiß-Bild; ein direkter Blick durch den verwendeten Filter sieht Dunkelrot aus. Die Chlorophyllfluoreszenz ist hier als helles Leuchten der Bambusblätter zu sehen.

selten, dass die Sonne von Morgens bis Abends durchgehend scheint, sehr häufig sorgen vorüberziehende Wolken für veränderliche Schatten am Boden<sup>9</sup>. Um im Mittel eine gute Photosyntheseeffizienz zu erreichen, müssen Pflanzen schnell auf wechselnde Lichtverhältnisse reagieren können, während unter schwierigen klimatischen Bedingungen insbesondere eine große Regelkapazität für die Stresstoleranz wichtig ist<sup>8</sup>. Eine direkte Messung der Kinetik des Violaxanthinzyklus eröffnet der Pflanzenzüchtung ein neues, bislang nur schwer zugängliches Selektionskriterium.

Während biologische Details im Kapitel 2 näher betrachtet werden, liegt die in der vorliegenden Dissertation gelöste experimentelle Herausforderung somit in der direkten Bestimmung des Verhältnisses von Violaxanthin zu Zeaxanthin *in vivo* und dessen zeitlicher Veränderung.

Zu diesem Zweck wurde Resonanz-Ramanspektroskopie eingesetzt, bei der ein Laserstrahl die Probe beleuchtet und gestreutes Licht aufgefangen wird, dessen Farbe sich von der des anregenden Laserstrahls unterscheidet. Anhand der dabei zusätzlich aufleuchtenden Farben können Rückschlüsse auf optisch zugängliche Schwingungszustände von in der Probe enthaltenen chemischen Substanzen gezogen werden<sup>10</sup>. Natürlich sind in Pflanzen viele verschiedene Substanzen miteinander vermischt enthalten, jedoch haben Carotinoide eine besonders ausgeprägte Wechselwirkung mit Licht, die zusätzlich noch durch eine gut abgestimmte Wahl der Farbe des Laserstrahls selbst hervorgehoben werden kann<sup>11,12</sup>.

Die ersten für diese Arbeit durchgeführten erkundenden Vorversuche an Tomatenpflan-

---

zen und Grünalgen ergaben, dass der für die Ramanspektroskopie nötige Laserstrahl das pflanzliche Gewebe bei längerer Einwirkdauer beschädigte. Da dies aus praktischen Gründen nicht mit einer sehr großen Zahl von Pflanzen kompensiert werden konnte, fiel die Wahl auf Mikroalgen. Diese sind sehr klein, sehr zahlreich, durch das umgebende Wasser gekühlt, lassen sich während der Messung kontinuierlich umwälzen, um Stress durch den Laserstrahl selbst zu vermeiden, und vermehren sich schnell. Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein Bioreaktor nach dem Airlift-Prinzip entwickelt, welcher sich gut für den interdisziplinären Einsatz eignet und trotz der fehlenden sterilen Anzuchtbedingungen eine dauerhafte Kulturführung ermöglicht.

Der Violaxanthinzyklus selbst ist mit dem Auge nicht zu beobachten, aber es gibt einige Algenarten, die in der Lage sind, noch andere Farbstoffe zu synthetisieren und sich unter Stress komplett zu verfärben<sup>13,14</sup> (Abb. 7.7). Solche Algenarten erwiesen sich als sehr nützlich für die ersten experimentellen Schritte zur Bestimmung von Carotinoiden *in vivo* mit Resonanz-Ramanspektroskopie und wurden in mehreren hier beschriebenen Experimenten verwendet. Besonders bekannt ist die "Blutregenauge" *Haematococcus pluvialis*, die unter Stress Astaxanthin synthetisiert<sup>15</sup> und bei massenhafter Vermehrung Teiche und andere kleine Gewässer rot verfärbt.

All diese Entwicklungen gemeinsam erlaubten schließlich die direkte Beobachtung der Anpassungen im Violaxanthinzyklus an wechselnde Lichtverhältnisse (Abb. 5.4).



# Kapitel 2

## Biologische Grundlagen

Die Intensität des Sonnenlichtes an einem Ort schwankt beträchtlich auf mehreren Zeitskalen: Der größte Unterschied besteht zwischen Tag und Nacht<sup>16</sup>, während die Tagesdauer regelmäßigen jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen ist<sup>17</sup>. Doch es gibt auch weniger vorhersagbare Schwankungen auf kürzeren Zeitskalen: Vorüberziehende Wolken sorgen für Schatten am Boden<sup>9</sup>, und Pflanzen im Unterholz eines Waldes sind durch Blätterbewegungen im Wind noch viel schnelleren Intensitätsänderungen ausgesetzt<sup>18</sup>.

Außer vom Licht hängt die Photosynthese noch von anderen Umweltfaktoren ab, wobei insbesondere die Temperatur<sup>7</sup>, Wasserverfügbarkeit<sup>19</sup> und Kohlenstoffdioxidkonzentration in der Luft<sup>20</sup> eine wesentliche Rolle spielen.

Um unter wechselnden Bedingungen eine gute Photosyntheseeffizienz aufrecht zu erhalten und sich vor Schäden durch Überlastung zu schützen, haben Pflanzen einige Mechanismen entwickelt, die es ihnen ermöglichen, mit Fluktuationen in der Beleuchtungsdauer und -intensität in verschiedenen Größenordnungen zurecht zu kommen.

Über Monate hinweg können Pflanzen langsam ihren Chlorophyllgehalt anpassen sowie morphologisch unterschiedliche Licht- und Schattenblätter ausbilden<sup>21</sup>. Viele Pflanzen verlieren außerdem im Winter ihre Blätter oder verfärben sich, um die geringe Wasserverfügbarkeit bei tiefen Temperaturen in Kombination mit zeitweise intensiver Sonneneinstrahlung zu überleben<sup>22</sup>. Im Laufe eines Tages können Pflanzen die Ausrichtung ihrer Blätter zur Sonne variieren<sup>23</sup>, was besonders bei sommerlicher Trockenheit gut zu beobachten ist, wenn die Blätter schlaff herunterhängen, um so wenig wie möglich der Sonne ausgesetzt zu sein. Wenngleich einige Arten von Pflanzen zu schnellen Bewegungen fähig sind<sup>24</sup>, geschieht die Anpassung an wechselnde Lichtverhältnisse auf einer Zeitskala von weniger als einem Tag mit chemischen Regelmechanismen.

Die Chlorophyllfluoreszenz erlaubt es Pflanzen, innerhalb von Sekunden auf Intensitätsänderungen zu reagieren, indem überschüssige Lichtenergie als Fluoreszenz wieder ab-

gestrahlt wird<sup>2,3</sup>. Das Chlorophyll, welches rotes und blaues Licht absorbiert, fluoresziert dabei im Dunkelroten, besonders im Bereich von 680 bis 700 nm. Die Stärke der Fluoreszenz wird dabei hauptsächlich von dem pH-Wert in den Thylakoiden beeinflusst<sup>25</sup>, welcher durch photochemische Reaktionen verändert wird und sich praktisch als Maß für Stress in Algen<sup>26</sup> und Pflanzenkulturen<sup>27</sup> verwenden lässt.

Außer Chlorophyll enthält das sogenannte Antennensystem noch akzessorische Pigmente. Diese sind Carotinoide, die wiederum in die gelben, sauerstoffhaltigen Xanthophylle und in die orangen bis roten sauerstofffreien Carotine unterteilt werden können. Neben anderen Funktionen tauschen die akzessorischen Pigmente Energie mit dem Chlorophyll aus. Die Richtung des Energietransfers hängt dabei von den individuellen Energiezuständen der Carotinoide ab<sup>1</sup>.

Insbesondere zwei Xanthophylle, Violaxanthin und Zeaxanthin, sind für einen Regelmechanismus unerlässlich, welcher als der Violaxanthinzyklus bekannt ist<sup>1</sup>. Wenngleich die exakte Funktionsweise in aktueller Literatur noch diskutiert wird<sup>28,29</sup>, hilft Violaxanthin beim Sammeln von Sonnenlicht, dessen absorbierte Energie anschließend ans Chlorophyll abgegeben wird und somit für photochemische Reaktionen zur Verfügung steht. Zeaxanthin dagegen strahlt überschüssige Energie aus dem Chlorophyll als Wärme ab.

In einer umkehrbaren enzymatischen Reaktion, an der Violaxanthin-Deepoxidase und Zeaxanthin-Epoxidase beteiligt sind<sup>7</sup>, können Pflanzen Violaxanthin über den Zwischenschritt Antheraxanthin in Zeaxanthin umwandeln. Dies geschieht innerhalb von Minuten bis einigen Stunden, wodurch die Pflanze das Verhältnis von gesammelter und wieder abgestrahlter Lichtenergie einstellen kann. Der Gesamtgehalt an Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin schließlich gibt die Regelkapazität vor, die durch die Synthese von zusätzlichem Violaxanthin erweitert werden kann<sup>28</sup>.

Reichen alle bislang beschriebenen Regelmechanismen nicht aus, so bleibt der Pflanze als letzte Rettung noch die sogenannte Photoinhibition, eine zeitweilige Zerstörung des Photosyntheseapparates<sup>30</sup>. Diese tritt jedoch nur unter extremen Bedingungen auf und benötigt anschließend eine sehr lange Regenerationszeit.

All diese Mechanismen zusammengenommen bestimmen die Möglichkeiten einer Pflanze, unter wechselnden Lichtverhältnissen zu wachsen und zu überleben.

Während die Chlorophyllfluoreszenz, welche ein Maß für photosynthetischen Stress darstellt, unter sichtbarer Anregung bei Wellenlängen ab 680 nm erscheint (siehe Abb. 8.3) und damit experimentell leicht zugänglich ist<sup>2,3</sup>, soll es in dieser Arbeit um den Violaxanthinzyklus gehen, dessen Vermessung eine experimentelle Herausforderung darstellt. Carotinoide selbst fluoreszieren zwar schwach im Bereich von 505 nm und 530 nm<sup>31</sup>, können aber von typischen Chlorophyllfluoreszenzmessgeräten prinzipbedingt nicht detektiert werden.

Der direkte experimentelle Zugang zum Violaxanthinzyklus ist schwierig und basierte bislang meistens auf Hochleistungs-Flüssigchromatographie<sup>32</sup>, welche eine vorhergehende aufwändige Probenpräparation erfordert. Aus diesem Grund existieren trotz der großen biologischen Bedeutung nur wenige experimentelle Arbeiten zur Kinetik des Violaxanthinzyklus<sup>6,7,16,28,33</sup>. Außerdem existiert aus der Arbeitsgruppe um Wolfgang Bilger aus Kiel noch ein weiterer Ansatz, die Kinetik des Violaxanthinzyklus über einen Zusammenhang mit Absorptionsmessungen zu bestimmen<sup>34</sup>.

Grundsätzlich ist die Detektion von Carotinoiden mit Ramanspektroskopie eine weit verbreitete Technik<sup>35</sup>, die auch eine Bestimmung der räumlichen Verteilung erlaubt<sup>15</sup>. Viele Studien zu funktionalen Aspekten und der Konfiguration der Carotinoide im Photosystem wurden erfolgreich mit Resonanz-Ramanspektroskopie durchgeführt<sup>12,36-38</sup>. Ein erster Hinweis zur möglichen Beobachtbarkeit des Violaxanthinzyklus mit Ramanspektroskopie ist außerdem in der Literatur zur Photoinhibition enthalten<sup>30</sup>.

Einzellige Mikroalgen lassen sich vergleichsweise leicht im Labor kultivieren und sind für ihre - auch kommerziell genutzte<sup>39</sup> - Fähigkeit zur Pigmentsynthese bekannt<sup>40,41</sup>. Außerdem ist es für die Ramanspektroskopie praktisch, dass die Kultur aus vielen separaten Individuen besteht, so dass sich der Einfluss des für die Ramanspektroskopie nötigen Laserstrahls zur Anregung durch kontinuierliche Umwälzung der Algenkultur auf eine sehr große Zahl von Zellen verteilt werden kann, womit der Stress durch die Messung selbst minimiert wird. Da Grünalgen den Aufbau ihres Photosystems mit allen höheren Pflanzen teilen<sup>7,42</sup>, lassen sich diese somit als Modellorganismus für Experimente am Violaxanthinzyklus verwenden.



# Kapitel 3

## Streuung und Fluoreszenz

Drei Wechselwirkungen zwischen Licht und Materie, die in diesem Kapitel vorgestellt werden, sind für die folgenden Experimente wesentlich: Rayleighstreuung, Ramanstreuung und Fluoreszenz, auf welche die mit einem Laser in eine Algenprobe eingestrahlte Intensität verteilt wird <sup>a</sup>.

Rayleigh- und Ramanstreuung sind Streuprozesse, deren gestreute Intensität  $I_s$  an einem Molekül wie an einem schwingenden Dipol beschrieben werden kann:

$$I_s \sim \omega_s^4 |\boldsymbol{\alpha} * \vec{E}|^2 \quad (3.1)$$

Mit der Intensität  $I$  eines Lichtstrahles, welche proportional zum Quadrat des elektrischen Feldvektors ist

$$I = \frac{1}{2} n c_0 \epsilon_0 |\vec{E}|^2 \quad (3.2)$$

folgt daraus, dass die Intensität der Streuung proportional zur eingestrahlten Lichtintensität, zur Zahl der schwingenden Dipole, zum Quadrat der Polarisierbarkeit und zur vierten Potenz der Energie der Anregungsphotonen ist.

Dabei sind:

- $\omega_s$  Frequenz des gestreuten Lichts
- $\boldsymbol{\alpha}$  Tensor der Polarisierbarkeit
- $\vec{E}$  Elektrischer Feldvektor des Anregungsstrahles
- $n$  Anzahl der schwingenden Dipole
- $c_0$  Lichtgeschwindigkeit im Vakuum
- $\epsilon_0$  Dielektrizitätskonstante des Vakuums

---

<sup>a</sup>Die Beschreibung der Effekte in diesem Abschnitt folgt dem Werk von Derek A. Long<sup>10</sup>.

Welche Art von Streuprozess vorliegt, hängt von dem Anfangszustand  $|i\rangle$  und dem Endzustand  $|f\rangle$  ab. Bei Rayleighstreuung sind Anfangs- und Endzustand identisch, während bei Ramanstreuung Anfangs- und Endzustand verschieden sind. Die Wahrscheinlichkeit für einen Übergang wird dabei durch den Polarisierbarkeitstensor gegeben:

$$(\alpha_{\rho\sigma})_{fi} = \frac{1}{\hbar} \sum_{r \neq i, f} \left\{ \frac{\langle f | \hat{p}_\rho | r \rangle \langle r | \hat{p}_\sigma | i \rangle}{\omega_{ri} - \omega_1 - i\Gamma_r} + \frac{\langle f | \hat{p}_\sigma | r \rangle \langle r | \hat{p}_\rho | i \rangle}{\omega_{rf} + \omega_1 + i\Gamma_r} \right\} \quad (3.3)$$

$|i\rangle$  Anfangszustand des Moleküls

$|f\rangle$  Endzustand

$|r\rangle$  Zwischenzustand

$\Gamma_r$  Spektrale Halbwertsbreite des Zwischenzustandes

$\hbar\omega_i$  Energie des Anfangszustandes

$\hbar\omega_f$  Energie des Endzustandes

$\hbar\omega_r$  Energie des Zwischenzustandes

$\hbar\omega_1$  Energie der Anregungsphotonen

Differenzen werden durch Doppelindizes angegeben:  $\omega_{fi} \equiv \omega_f - \omega_i$

Die Energie der gestreuten Photonen wird durch

$$\hbar\omega_s = \hbar(\omega_1 - \omega_{fi}) \quad (3.4)$$

gegeben, wobei  $\hbar\omega_{fi}$  die Energiedifferenz von Anfangs- und Endzustand darstellt. Bei Rayleighstreuung sind Anfangs- und Endzustand identisch, es findet also keine Energieänderung der gestreuten Photonen statt, was in der klassischen Betrachtungsweise einer elastischen Streuung entspricht. Im Falle der Ramanstreuung sind die beiden Zustände verschieden, wobei die Wahrscheinlichkeit für einen energetisch höher liegenden Endzustand (Stokes-Linien) auf Grund der Besetzung der Zustände bei Raumtemperatur gemäß der Boltzmannverteilung überwiegt.

Der Zwischenzustand  $|r\rangle$ , in den das Molekül durch den Anregungsstrahl gehoben wird, kann dabei beliebig sein, er kann, muss aber nicht mit einem erlaubten Zustand des Moleküls übereinstimmen, wobei in der Theorie dann "virtuelle" Zustände auftreten. Eine besonders wichtige Eigenschaft ist im Nenner  $\omega_{ri} - \omega_1 - i\Gamma_r$  des ersten Termes der Gleichung 3.3 beschrieben: Kommt die Energie der Anregungsphotonen in den Bereich eines Überganges des Moleküls, so steigt die Intensität der betreffenden Ramanlinie infolge einer Resonanzverstärkung an, was in den folgenden Experimenten ausgenutzt wird.

Der Tensor der Polarisierbarkeit besitzt grundsätzlich Richtungsabhängigkeiten, bei Messungen an Flüssigkeiten mit Multimode-Glasfasern sind jedoch alle möglichen räumlichen Orientierungen gleichzeitig vorhanden und sowohl Anregung als auch Detektion

erfolgen unpolarisiert. In diesem Fall wird die gestreute Intensität mathematisch mit Hilfe von Isotropieintegralen über die Invarianten des Polarisierbarkeitstensors ausgedrückt. Wichtig für die kommenden Experimente ist hier jedoch nur, dass die gestreute Intensität stets proportional zum Quadrat der Elemente des Polarisierbarkeitstensors ist.

Aus praktischen Gründen wurde für die Ramanstreuung als energetische Verschiebung relativ zur Energie der Anregungsphotonen die Einheit "relative Wellenzahl" ( $m^{-1} = 0,01cm^{-1}$ ) eingeführt, die zur Energiedifferenz des eingestrahlten und gestreuten Photons proportional ist und deren Absolutwert die Energie  $E_{fi}$  des Überganges vom Anfangs- zum Endzustand widerspiegelt.

$$\frac{1}{\lambda_1} - \frac{1}{\lambda_s} = \frac{\omega_1}{2\pi c_0} - \frac{\omega_s}{2\pi c_0} = \frac{1}{2\pi c_0} * (\omega_1 - \omega_s) = \frac{1}{2\pi c_0} \omega_{fi} = \frac{E_{fi}}{hc_0} \quad (3.5)$$

$\lambda_1$  Wellenlänge der Anregungsphotonen

$\lambda_s$  Wellenlänge der gestreuten Photonen

Es existieren verschiedene Konventionen über das Vorzeichen der Energiedifferenz, diese Arbeit folgt durchgängig der Konvention des "Journal of Raman Spectroscopy", wonach Stokes-Linien positive relative Wellenzahlen zugeordnet werden.

- (Raman-) Streuung tritt (bei Substanzen mit ramanaktiven Vibrationszuständen) unabhängig von der Anregungswellenlänge auf.
- Die Intensität steigt grundsätzlich proportional zur vierten Potenz der zur Anregung verwendeten Photonenenergie an.
- Die spektrale Breite einer einzelnen Ramanlinie resultiert aus der Unschärfe eines Überganges und der Auflösung des Spektrometers.
- Resonanzverstärkung tritt auf, wenn die eingestrahlte Photonenenergie mit einem elektronischen Übergang des Moleküls übereinstimmt und korreliert deshalb mit dem Absorptionsspektrum.
- Ausnutzung von Resonanzbedingungen für die Ramanstreuung hilft, diese gegenüber der Fluoreszenz zu verstärken und ermöglicht so unter schwierigen experimentellen Bedingungen ein akzeptables Signal-zu-Rausch-Verhältnis.
- Die hier beschriebene Theorie ist nur solange gültig, wie sich die einzelnen streuenden Molekül(teile) nicht untereinander beeinflussen. Ramanspektren einer Mischung mehrerer Substanzen in hohen Konzentrationen lassen sich auf Grund von Reabsorptionen nur näherungsweise als Linearkombinationen der einzelnen Ramanspektren darstellen.

Fluoreszenz ist im Gegensatz zur Rayleigh- und Ramanstreuung kein Streuprozess und tritt nur auf, wenn das Molekül die für die Anregung verwendeten Photonen absorbiert. In diesem Fall geht das elektronisch angeregte Molekül mit großer Wahrscheinlichkeit zunächst mit einem strahlungslosen Übergang unter Wärmeabgabe in das unterste Vibrationsniveau des ersten elektronisch angeregten Zustandes über, von wo aus es mehrere mögliche Kombinationen von strahlenden und nicht-strahlenden Übergängen in die Vibrationsniveaus des elektronischen Grundzustandes gibt. Die Fluoreszenz ist spektral sehr breit, weil es meist viele mögliche Vibrationsniveaus gibt, von denen jedoch nicht alle auch über die Ramanstreuung zugänglich sein müssen.

- Fluoreszenz tritt auf, wenn die Photonenenergie mindestens zur Anregung des ersten elektronischen Zustandes ausreicht, wobei die Intensität in charakteristischer Weise von der Anregungswellenlänge abhängt.
- Fluoreszenz ist spektral sehr breit und bewirkt einen großen Teil der Grundlinie eines resonant angeregten Ramanspektrums.
- Bei Substanzen mit mehreren fluoreszierenden Zentren kann sich auch die spektrale Form der Fluoreszenz mit der Anregungswellenlänge verändern.

# Kapitel 4

## Hauptkomponentenzerlegung

Werden zwei Substanzen gemischt, die unterschiedliche Ramanspektren besitzen und nicht miteinander reagieren, so ergibt sich das Ramanspektrum der Mischung unter Vernachlässigung von Reabsorption als Linearkombination gemäß des Mischungsverhältnisses der beiden einzelnen Komponentenspektren. Wenn die Komponentenspektren der reinen Substanzen unbekannt sind, aber dafür mehrere Proben mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen derselben vorliegen, ist es durch Betrachtung, welche Banden sich unabhängig voneinander verändern können zumindest näherungsweise möglich, die Spektren der einzelnen Reinsubstanzen und deren Anteil an der Mischung zu bestimmen. Dies lässt sich analog auch auf mehrere Substanzen ausweiten<sup>b</sup>.

Dabei können allerdings nur solche Anteile in den Ramanspektren voneinander getrennt werden, die sich während der Messungen unabhängig voneinander verändern. Sind beispielsweise zwei unterschiedliche Stoffe stets in gleicher Konzentration in den gemessenen Proben vorhanden, so lässt sich mit diesem Verfahren nur ein Spektrum bestimmen, welches die Mischung dieser beiden Stoffe zeigt.

Analog zur Hauptachsentransformation in der linearen Algebra sind die Ramanspektren die Vektoren, die Konzentration deren Linearfaktoren. Somit lassen sich höchstens so viele Basisvektoren entsprechende Spektren von Einzelkomponenten bestimmen, wie unterschiedliche gemessene Spektren vorliegen.

Da allerdings die Messung von Ramanspektren stets mit Rauschen behaftet ist, können Ramanspektren nur näherungsweise in Hauptkomponenten zerlegt werden. Für eine gute Näherung ist es deshalb sinnvoll, sehr viel mehr unterschiedliche Mischungen zu vermessen, als einzelne Komponenten gesucht werden sollen, um die Einflüsse des - zufälligen - Rauschens ausmitteln zu können.

---

<sup>b</sup>Die Hauptkomponentenzerlegung wird in<sup>43</sup> im Detail erläutert, die in diesem Kapitel verwendete Schreibweise folgt jedoch der Dokumentation der verwendeten Implementierung “MCR-ALS command line” <http://www.mcrals.info/> (Letzter Zugriff am 26. Januar 2018)

$$D = CS^T + E \quad (4.1)$$

- D* Matrix der experimentell gewonnenen Spektren
- C* Vektor der Konzentrationen der einzelnen Komponenten
- T* Transposition
- S* Matrix der Spektren der Komponenten
- E* Matrix der nicht als Linearkombination der berechneten Komponentenspektren darstellbaren spektralen Anteile, vor allem Rauschen und sporadisch auftretende Artefakte

Kurz zusammengefasst wird also versucht, näherungsweise einen Satz mit einer vorgegebenen Anzahl von Komponentenspektren zu finden, mit dem so viel wie möglich der gemessenen Spektren (*D*) abgedeckt werden kann. Was nach Abzug der ermittelten Linearkombination (*C*) der Komponentenspektren (*S*) von den Messergebnissen (*D*) übrig bleibt (*E*), sollte im Idealfall nur noch aus Rauschen bestehen.

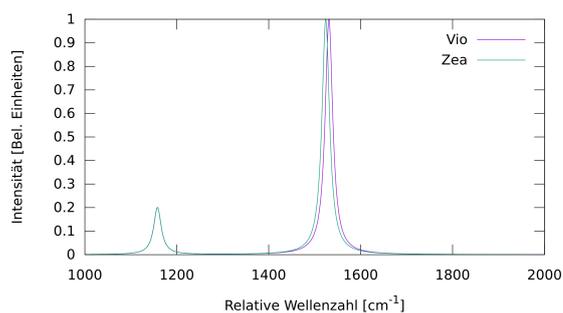
Insbesondere die Zahl der Komponenten ist kritisch für das Gelingen der Näherungslösung, allerdings lässt sich diese manuell bestimmen: Werden mehr Komponentenspektren erwartet, als tatsächlich unabhängige Komponenten in den Proben vorhanden sind, so werden auch einige der Komponentenspektren untereinander linear abhängig oder größtenteils identisch sein. Werden zu wenige Komponenten angepasst, so können die Messergebnisse nicht durch den Satz von Komponentenspektren dargestellt werden und es bleibt nach Abzug der ermittelten Linearkombinationen von den Messergebnissen mehr als nur Rauschen übrig.

Verschiedene Ansätze für die algorithmische Bestimmung der Zahl der Komponenten existieren in der Literatur<sup>43</sup>, die aber in dieser Arbeit nicht verwendet worden sind, da durch die Art der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente bereits eine Abschätzung der Zahl der unabhängigen Komponenten möglich gewesen ist und genug Rechenzeit zur anschließenden manuellen Bestimmung der optimalen Anzahl zur Verfügung stand.

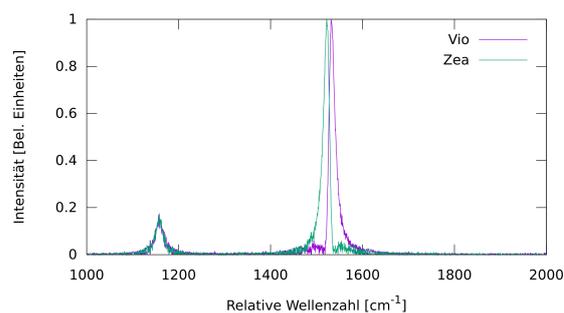
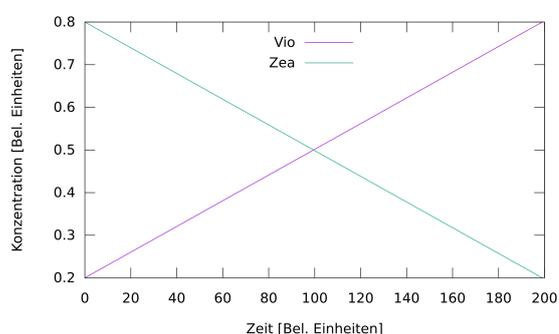
In dieser Arbeit wurde die von Romà Tauler und Anna de Juan als freie Software zur Verfügung gestellte Implementierung “MCR-ALS command line”<sup>c</sup> auf GNU Octave<sup>d</sup> verwendet. Bei der Optimierung selbst können weitere Randbedingungen eingestellt werden; da bei Ramanspektren und Konzentrationen physikalisch keine negativen Werte sinnvoll sind, wurden ausschließlich positive Ergebnisse als Randbedingung erzwungen.

<sup>c</sup>Verfügbar unter <http://www.mcrals.info/> (Letzter Zugriff am 26. Januar 2018)

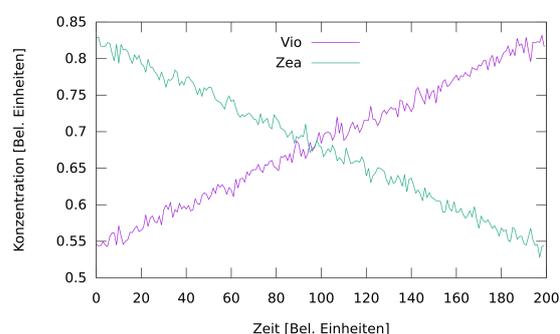
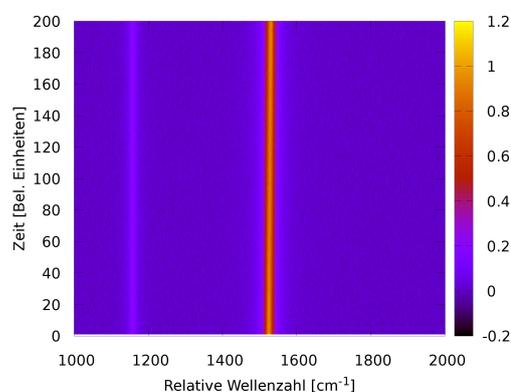
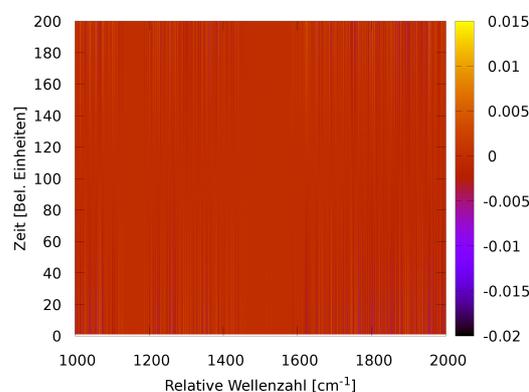
<sup>d</sup>Verfügbar unter <https://www.gnu.org/software/octave/> (Letzter Zugriff am 26. Januar 2018)



(a) Vorgegebene Ramanspektren

(b) Mit MCR-ALS bestimmte Ramanspektren  $S$ 

(c) Vorgegebene Konzentrationen

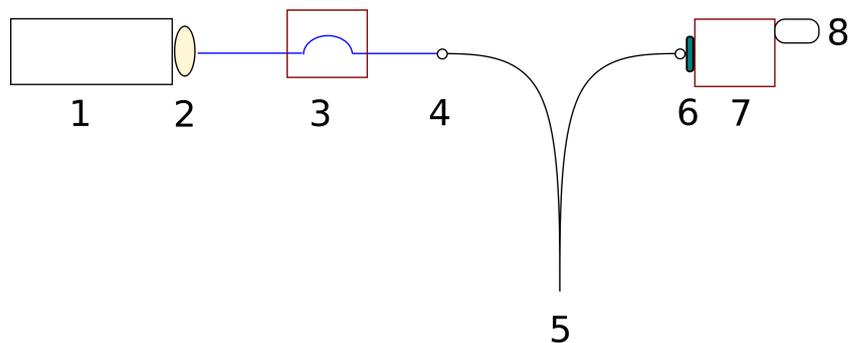
(d) Mit MCR-ALS bestimmte Konzentrationen  $C$ (e) Resonanzkarte mit Rauschen  $D = CS^T + E$ (f) Residuum  $E$  von MCR-ALS

**Abbildung 4.1:** Ein Beispiel für die Anwendung der Hauptkomponentenzerlegung. Es wurden (a) zwei synthetische Ramanspektren “Vio” und “Zea” sowie (c) untereinander nicht linear abhängige Konzentrationsverläufe vorgegeben. Diese wurden (e) miteinander multipliziert und mit Rauschen versehen. Die aus (e) mit Hilfe der Hauptkomponentenzerlegung bestimmten Ramanspektren (b) und Konzentrationsverläufe (d) sind in der rechten Spalte zu sehen, wobei (f) das Residuum darstellt und nur aus Rauschen besteht. Zu beachten ist, dass die Spektren jeweils auf ihren höchsten Punkt normiert sind, die dazu entsprechend skalierten Konzentrationen (d) aber nur qualitativ mit dem vorgegebenen Konzentrationsverlauf (c) übereinstimmen. Diese Unsicherheit sowie die deformierte Basis der Ramanlinien bei  $1550 \text{ cm}^{-1}$  in (b) sind durch das Hinzufügen des Rauschens bedingt.



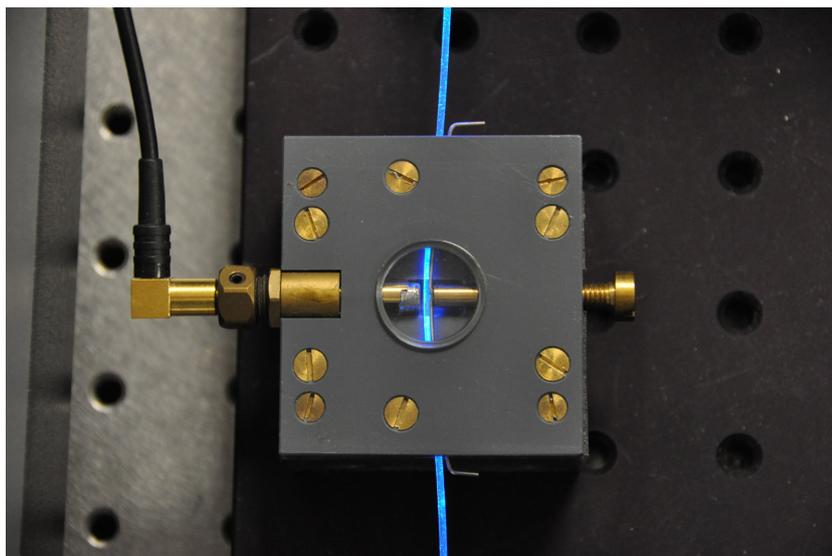
# Kapitel 5

## Experimenteller Aufbau für die Ramanmessung



**Abbildung 5.1:** Optische Komponenten im Aufbau zur Messung von Resonanzkarten mit einem durchstimmbaren optisch-parametrischen Oszillator (OPO). (1) Optisch-parametrischer Oszillator, (2) Linse zur Einkopplung in eine Glasfaser, (3) Biegehalterung mit Photodiode zur Bestimmung der Pulsenergien, (4) Übergang zum Faserbündel, (5) Probenende des Faserbündels, (6) Einkopplung ins Spektrometer mit einem Tiefpass-Kantenfilter zur Entfernung des Rayleighpeaks, (7) Spektrometer, (8) Kamera.

Für die Messung der Resonanzkarten (Abb. 5.1 und 5.8c) wurde ein optisch-parametrischer Oszillator (Abb. 5.8a, OPO, PG122/UV, EKSPLA uab, Vilnius, Litauen) verwendet, welcher in den drei Wellenlängenbereichen 210 nm bis 354 nm (Signal, frequenzverdoppelt), 420 nm bis 709 nm (Signal) und 710 nm bis 2300 nm (Idler) frei durchstimmbar ist. Für die hier gezeigten Versuche wurde jedoch nur der sichtbare Bereich von 440 nm bis 632 nm genutzt. Die abgegebenen Pulse haben eine Dauer von 4 ns und eine Wiederholrate von 10 Hz. Die Fasereinkopplung ist auf Grund des ungleichmäßigen Rechteckprofils des Strahls schwierig. Dazu kommt, dass der Fokus der zum Einkoppeln verwendeten Linse auf keinem Fall wie sonst üblich innerhalb der Faser liegen darf, da ansonsten infolge eines Plasmadurchbruchs der Faserkern im Inneren der Faser beschädigt wird. Da



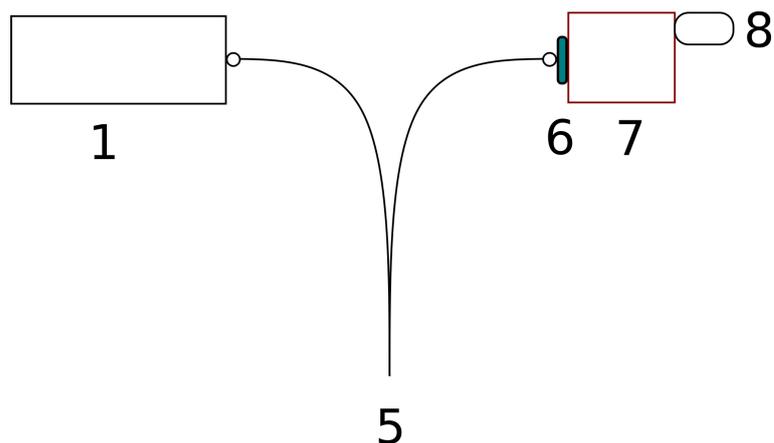
**Abbildung 5.2:** Anordnung zur Pulsenergiemessung. Mit der Stellschraube kann die Federspannung und damit der Biegeradius eingestellt werden. Austretendes Licht wird mit einer Photodiode gemessen.

die Pulsenergien des optisch-parametrischen Oszillators durch mehrere hintereinandergeschaltete nichtlineare Effekte stark schwanken, wurde ein selbstgebauter Pulsenergie-detektor eingesetzt (Abb. 5.2). Dieser besteht aus einem Stück einer Quarzglasfaser mit 800  $\mu\text{m}$  Kerndurchmesser, dessen Mantel an einer 8 mm langen Stelle mit einem heißen LötKolben aufgeschmolzen worden ist. Die Faser wird an der entmantelten Stelle zwischen zwei feststehenden runden Elementen mit einer auf einer Schraube befestigten Spannfeder so gebogen, dass je nach eingestelltem Biegeradius ein Teil des Lichtes austritt und auf eine Photodiode (S1336-18BQ, Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan) fällt<sup>e</sup>. Um das sehr schnelle elektrische Signal für die weitere Verarbeitung zeitlich zu strecken, wurde ein 100 nF Folienkondensator parallel zur Photodiode geschaltet. Das elektrische Signal wurde nach Verstärkung (Current-Amplifier DLPCA-100, FEMTO Messtechnik GmbH, Berlin, Germany) digitalisiert (Abb. 5.9), über den gesamten Puls integriert und mit einem Laserleistungsmessgerät (ED-100AUV V5, Gentec Electro-Optics Inc., Quebec, Kanada) kalibriert. Die Pulsenergien sind außerdem stark wellenlängenabhängig, wobei in dem verwendeten Wellenlängenbereich die 200 mJ Anregungsenergie pro Spektrum typischerweise in weniger als einer Minute akkumuliert wurde.

Für Langzeitmessungen und Versuche, bei denen es auf die genaue Linienlagen ankommt (Abb. 5.3, 5.4 und 5.8d), wurde ein frequenz- und energiestabilisierter Single-Mode-Dauerstrichlaser mit 50 mW Ausgangsleistung bei 473 nm verwendet (Abb. 5.8b, Excelsior 473, Spectra physics, Santa Clara, USA).

Sämtliche Messungen wurden mit einem nach Maß gefertigten, salzwasserbeständigen

<sup>e</sup>Der mechanische Aufbau dafür wurde von Merve Wollweber<sup>44</sup> und Ronald Krebs<sup>45</sup> im Rahmen ihrer Dissertationen zur Optoakustik im Institut für Biophysik entwickelt .

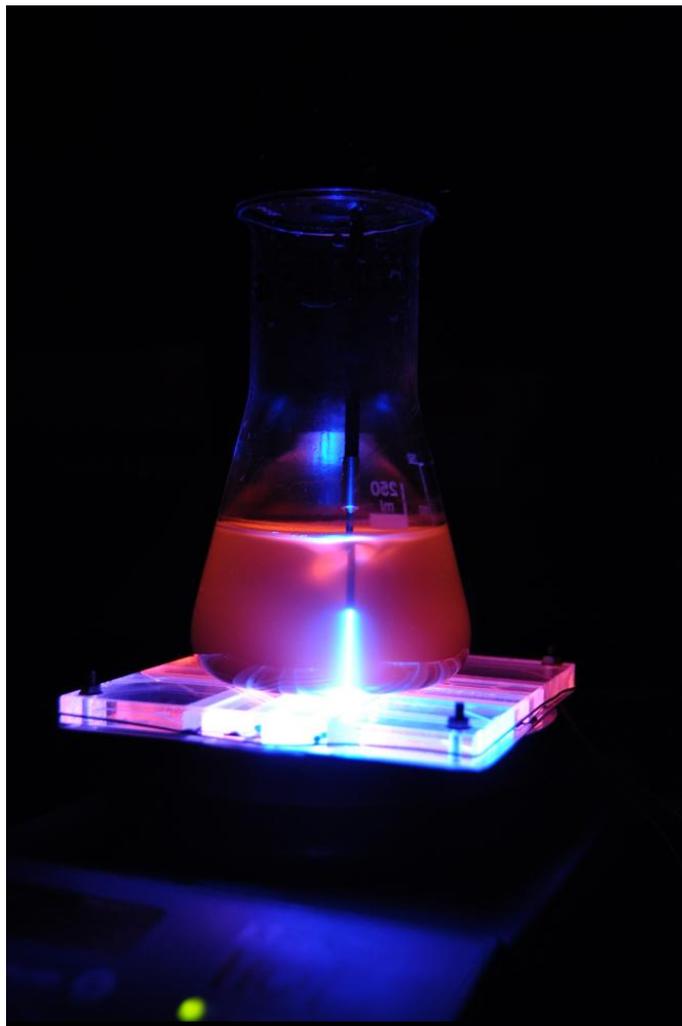


**Abbildung 5.3:** Optische Komponenten im Aufbau zur präzisen Langzeitmessung von Resonanz-Ramanspektren mit einem Festfrequenzlaser. (1) Festfrequenzlaser, (5) Probenende des Faserbündels, (6) Einkopplung ins Spektrometer mit einem Tiefpass-Kantenfilter zur Entfernung des Rayleighpeaks, (7) Spektrometer, (8) Kamera.

Faserbündel durchgeführt. Es besteht aus einer Quarzglasfaser mit  $800\ \mu\text{m}$  Kerndurchmesser zur Anregung, welche kreisförmig von 18 Quarzglasfasern mit  $200\ \mu\text{m}$  Kerndurchmesser umgeben ist, die auf der Spektrometerseite passend zum Eingangsspalt als Linie angeordnet sind (Konstruktionszeichnung in Abb. A.1, CeramOptec GmbH, Bonn, Deutschland).

Spektren wurden mit einem SR500 Spektrometer (Abb. 5.8e, Andor Technology Ltd, Belfast, Nordirland) aufgenommen. Dieses besitzt einen manuell einstellbaren Eintrittsspalt, welcher für das *in vivo* Spektrum menschlicher Haut (Abb. 6.9) auf  $10\ \mu\text{m}$ , für die *in vivo* Resonanzkarten (Kapitel 10) auf  $100\ \mu\text{m}$  und für alle anderen Messungen in dieser Dissertation auf  $20\ \mu\text{m}$  eingestellt worden ist. Sieben Tiefpass-Kantenfilter bei  $446\ \text{nm}$ ,  $458\ \text{nm}$ ,  $473\ \text{nm}$ ,  $488\ \text{nm}$ ,  $496\ \text{nm}$ ,  $514\ \text{nm}$  und  $532\ \text{nm}$  (Semrock Inc., Rochester, USA) standen zur Verfügung, von denen jeweils sechs gleichzeitig im Filterrad montiert werden konnten. In Kombination mit einer elektrisch auf  $-60^\circ\text{C}$  gekühlten Kamera mit 16 Bit Dynamikbereich und  $2048 \times 512$  Pixeln, zu 2048 Kanälen vereint (Abb. 5.8f, Newton DU940P, Andor Technology Ltd, Belfast, Nordirland) wurden zwei unterschiedliche Gitter verwendet: Für die Abbildungen 11.5 und 11.6 wurde ein Gitter mit  $2400\ \text{Linien/mm}$  (Blazing:  $500\ \text{nm}$ ) verwendet, alle anderen Messungen in dieser Dissertation sind mit einem  $1200\ \text{Linien/mm}$  Gitter (Blazing:  $500\ \text{nm}$ ) entstanden. Die Auflösung variierte je nach spektralem Bereich und Gitter, war jedoch stets besser als  $1,1\ \text{cm}^{-1}$  pro Pixel. Einschläge kosmischer Strahlung (siehe Abb. 5.5) wurden bereits während der aus mehreren Spektren akkumulierten Aufnahme durch Vergleich der einzelnen gemessenen Spektren und entsprechender Interpolation entfernt.

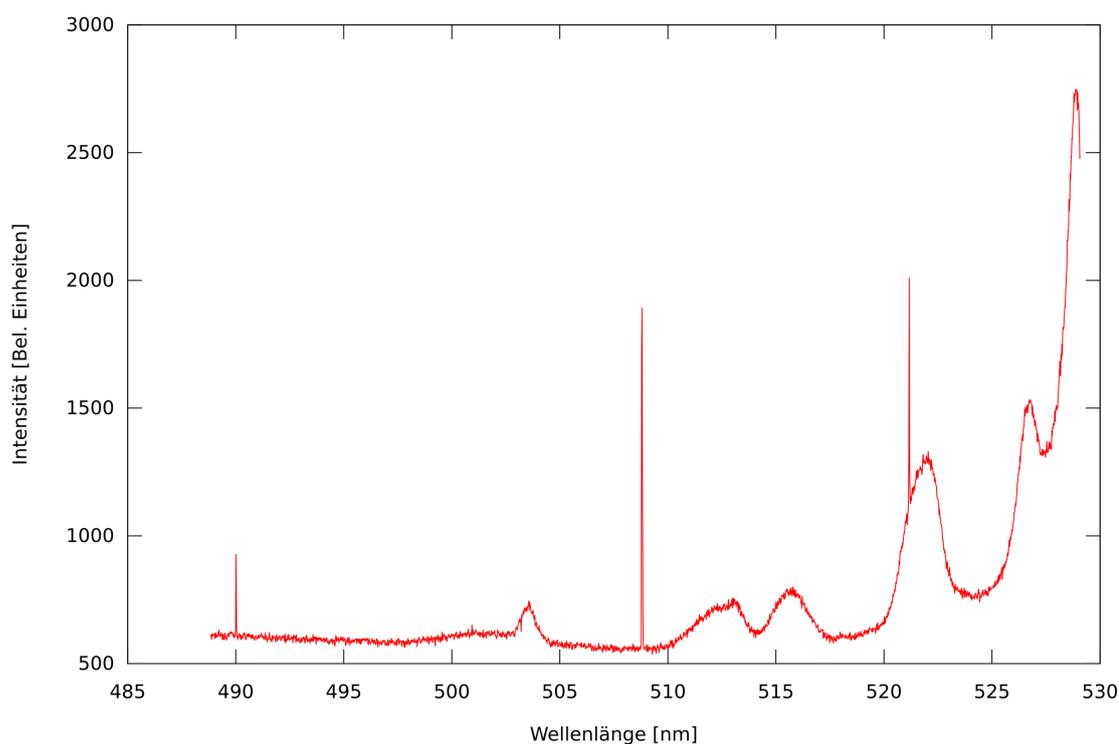
Für die Offsetkalibration des Spektrometers wurden mit dem optisch-parametrischen Oszillator je nach Experiment die Ramanlinien von Bariumsulfat oder Ethanol (siehe Kap. 9) verwendet. Bei Dauerstrichmessungen wurden Neonspektrallinien verwendet (Abb. 5.7).



**Abbildung 5.4:** Eine gerührte Kultur von *Dunaliella salina* im Erlenmeyerkolben. Zwischen Magnetührer und Glaskolben ist eine Plexiglasplatte zu sehen, in die acht Neonglimmlampen zur Wellenlängenkalibration eingelassen sind (vgl. Abb. 5.6). Von oben ragt das für die Ramanmessung verwendete Faserbündel in die Kultur, woraus ein blauer Laserstrahl in die Kultur scheint. Das rote Leuchten der Kultur ist in diesem Fall nicht die Chlorophyllfluoreszenz, sondern stammt von den unterhalb des Kolbens leuchtenden Neonglimmlampen. Die Lichtquelle für die Stressbeleuchtung (vgl. Abb. 5.8d) ist auf diesem Bild nicht vorhanden.

Um diese auch im laufenden Experiment ohne eine Änderung am mechanischen Aufbau verfügbar zu haben, wurden acht Neonglimmlampen in eine Plexiglasplatte eingefügt, welche anschließend von einer Seite mit einem reflektierenden Aluminiumblech abgedeckt wurde (Abb. 5.6).

Für die Messung der Pulsenergien und zur Steuerung der Langzeitexperimente wurde eine Steuerplatine entwickelt (Abb. 5.9). Diese besteht aus einer Microcontroller-Experimentierplatine (LM4F120 Stellaris Launchpad, Texas Instruments, Dallas, USA), zwei BNC-Buchsen mit resistiven Spannungsteilern, einem Reed-Relais zum Schalten der für die Wellenlängenkalibration verwendeten Neonglimmlampen, und einem Leistungs-Feldef-

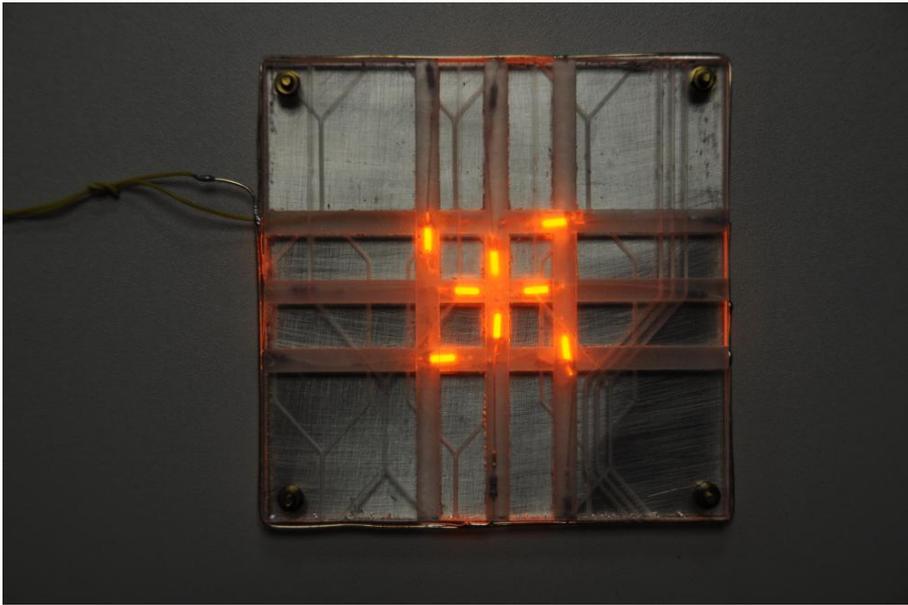


**Abbildung 5.5:** Rohdaten eines Ramanspektrums von *Haematococcus pluvialis*, angeregt mit 478 nm, welches zur Demonstration der kosmischen Einschläge mit nur einer Belichtung des Kamerachips und ohne Akkumulation aufgenommen worden ist. Die sehr scharfen Peaks bei 490 nm, 509 nm und 521 nm sind die Folge von Einschlägen kosmischer Strahlung in den Kamerachip. Diese wurden für alle anderen in dieser Arbeit gezeigten Spektren schon während der Aufnahme durch Akkumulation und entsprechende Interpolation entfernt.

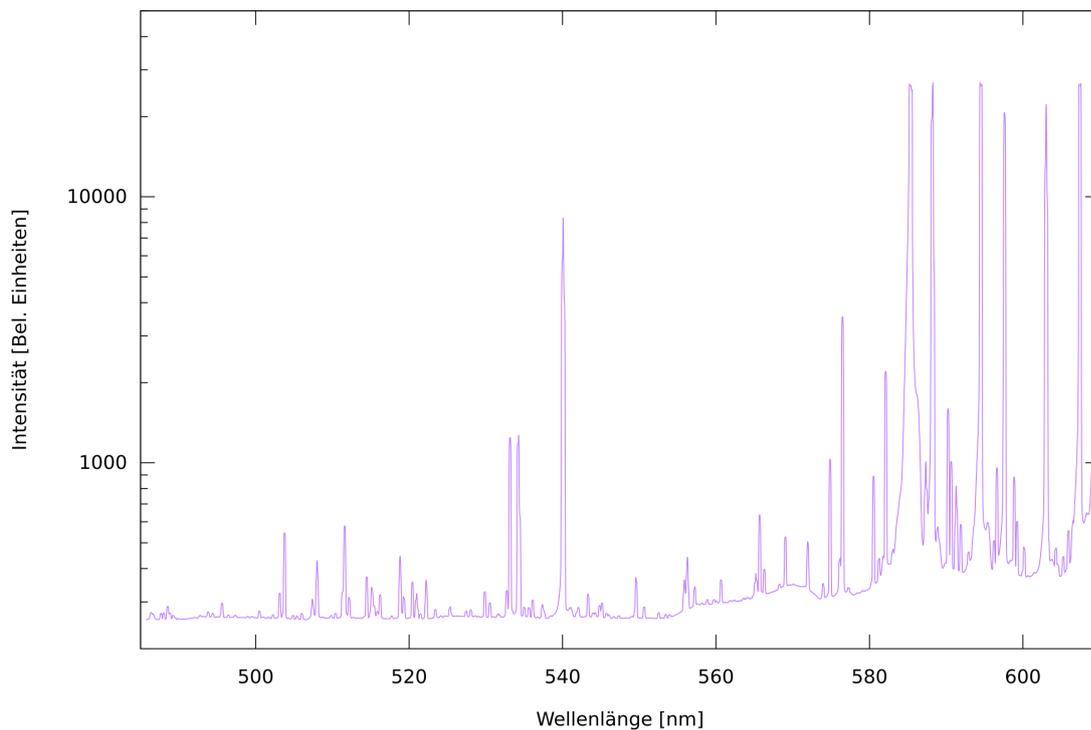
fekttransistor zum Schalten der Stressbeleuchtung. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der optimierende Forth-Compiler “Mecrisp-Stellaris” entwickelt, welcher auf verschiedenen ARM-Cortex-Microcontrollern läuft<sup>f</sup>. Die Programmiersprache Forth wurde 1971 von Charles Moore insbesondere zur Steuerung von Radioteleskopen entwickelt<sup>46</sup>. Die Sprache Forth ist durch ihre Interaktivität und Nähe zur Hardware gut für die Steuerung von Experimenten geeignet und wurde im Rahmen dieser Arbeit um Konstantenfaltung und Registerallokation erweitert, um sie auch für digitale Signalverarbeitung in Echtzeit nutzbar zu machen. Auf Basis von Mecrisp-Stellaris wurde schließlich die Software zur Pulsenergiemessung sowie zur Steuerung der Stress- und Kalibrationslampen implementiert. Eine detaillierte Einführung in Mecrisp-Stellaris würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, deshalb soll an dieser Stelle auf das von mir geschriebene und 2015 erschienene “Sonderheft ARM”<sup>47</sup> der Deutschen Forth-Gesellschaft verwiesen werden<sup>g</sup>. Weitere Anwendungen ergaben sich an der Fachhochschule Wedel<sup>48</sup>.

<sup>f</sup>Verfügbar unter <http://mecrisp.sourceforge.net/> (Letzter Zugriff am 26. Januar 2018)

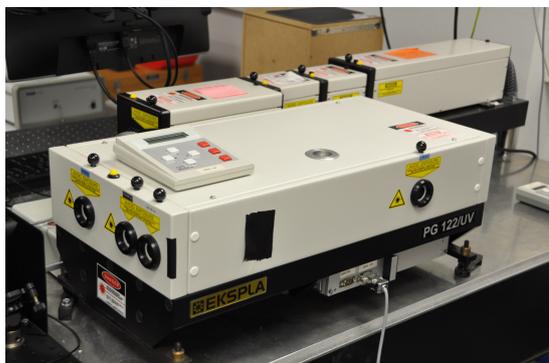
<sup>g</sup>Verfügbar im Archiv der Deutschen Forth-Gesellschaft unter <http://forth-ev.de/> (Letzter Zugriff am 26. Januar 2018)



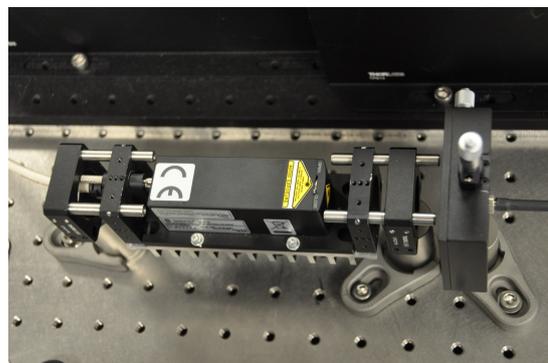
**Abbildung 5.6:** Zur Kalibration wurden acht Neonglimmlampen in eine Plexiglasplatte eingefügt, in die von der Rückseite Kanäle gefräst worden sind. Eine Aluminiumplatte reflektiert das zur Rückseite austretende Licht.



**Abbildung 5.7:** Zur Kalibration der Wellenlängen verwendetes Spektrum einer Neonglimmlampe. Im Gegensatz zu den häufig verwendeten Quecksilberdampfampfen besitzt Neon sehr viele Linien im für Resonanz-Ramanspektroskopie an Carotinoiden wichtigen blaugrünen Bereich. Einige der orangen Linien übersteuern den Kamerachip bei dieser Aufnahme.



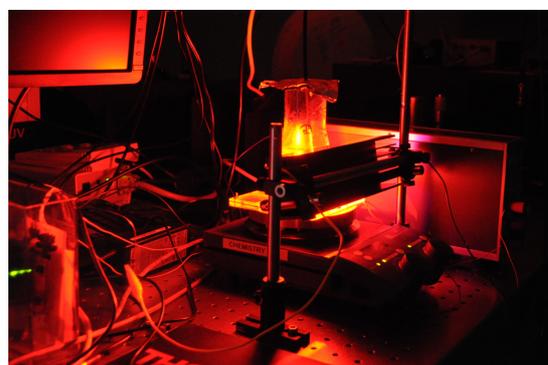
(a) Optisch-parametrischer Oszillator



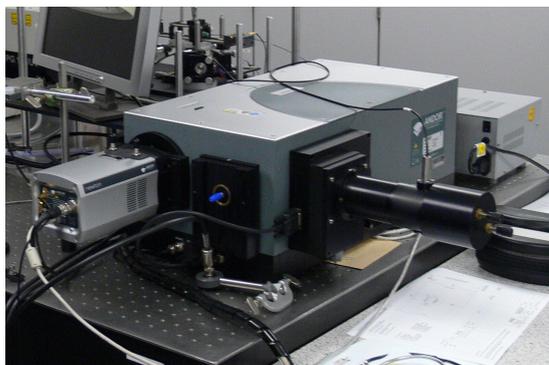
(b) Blauer Dauerstrichlaser



(c) Algenprobe in Küvette



(d) Langzeitmessung mit Stressbeleuchtung

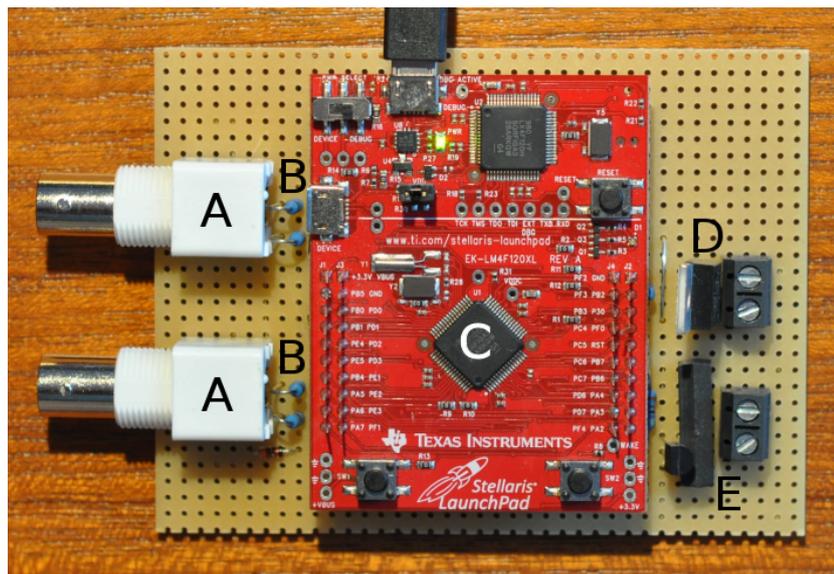


(e) Spektrometer



(f) Kamera

**Abbildung 5.8:** Mit einem optisch-parametrischen Oszillator (a) wurden Algenproben in Küvetten (c) für die Bestimmung von Resonanzkarten in verschiedenen Stresszuständen angeregt (Kap. 10). Die Messungen zur Kinetik des Violaxanthinzyklus (Kap. 11) erfolgten mit einem blauen Dauerstrichlaser (b) an gerührten Kulturen (Abb. 5.4), wobei zusätzlich Stressbeleuchtung in Rot (d) und Blau in die Kultur eingestrahlt werden konnte. Für die Aufnahme sämtlicher Ramanspektren wurden ein Spektrometer (e) und eine Kamera (f) verwendet.



**Abbildung 5.9:** Zur Messung der eingestrahlten Pulsenergien sowie zur Steuerung von Stressbeleuchtung und Neonglimmlampen entwickelte Schaltung. (A) Signaleingänge via BNC-Buchsen, (B) Resistive Spannungsteiler zur Anpassung der Messbereiche, (C) Microcontroller-Experimentierplatine, (D) Leistungs-Feldeffekttransistor zum Schalten der Stressbeleuchtung, (E) Reed-Relais zum Schalten der Neonglimmlampen

# Kapitel 6

## Grundlinienkorrektur<sup>h</sup>

### 6.1 Einleitung

Bei Ramanspektroskopie an biologischen Proben und bei Anregung mit sichtbarem Licht tritt auch Fluoreszenz auf, welche zum Hintergrund eines typischen unbearbeiteten Ramanspektrums gehört (Abb. 6.9 und 11.1). Zur weiteren Auswertung ist eine Grundlinienkorrektur unabdingbar, welche die gewünschten Ramanlinien vom Hintergrund abtrennen kann.

Verschiedene experimentelle Verfahren zielen darauf ab, den Hintergrund in den Ramanspektren bereits im Experiment zu verringern. Es ist möglich, zwei Ramanspektren mit nur geringfügig unterschiedlichen Anregungswellenlängen aufzunehmen und eine Differenz der beiden Spektren zu bestimmen<sup>50–52</sup>. Dieses Verfahren basiert auf der Annahme, dass sich die exakte Form des breitbandigen Fluoreszenzhintergrundes nicht ändert, während die Ramanstreuung der Veränderung der Anregungswellenlänge direkt folgt. Die experimentelle Schwierigkeit besteht darin, dass mindestens zwei verschiedene, dicht beieinander liegende Anregungswellenlängen benötigt werden, ein Kriterium, welches für gewöhnlich nur durchstimmbare Laser erfüllen. Das hintergrundfreie, grundlinienkorrigierte Spektrum kann anschließend mathematisch aus der Differenz der beiden Rohspektren rekonstruiert werden. Die Annahme, dass sich der Hintergrund bei leicht verschobener Anregungswellenlänge nicht ändert ist aber bei *in vivo* Messungen mit Vorsicht zu sehen: Jedes individuelle Spektrum könnte einen anderen Hintergrund haben, welcher sich in Abhängigkeit von der akkumulierter Bestrahlung, der Zeit und der Anregungswellenlänge ändert. Im Resonanzbereich schließlich können auch kleine Veränderungen in der Anregungswellenlänge große Intensitätsschwankungen der Ramanlinien bewirken<sup>10</sup>.

---

<sup>h</sup>Der Text und alle Bilder in diesem Kapitel wurden bereits vorab in ähnlicher Form unter dem Titel “Iterative morphological and mollifier-based baseline correction for Raman spectra” im Journal of Raman Spectroscopy publiziert<sup>49</sup>.

Ein Ausbleichen der Fluorophore<sup>53-55</sup> mit sehr hohen Anregungsintensitäten über eine lange Zeit hinweg sollte bei biologischen Proben nicht zur Grundlinienkorrektur verwendet werden. Insbesondere das gleichzeitige, vollständige Ausbleichen mehrerer Fluorophore in lebenden Proben dürfte kaum gelingen. Außerdem ist es sehr wahrscheinlich, dass solch eine starke Bestrahlung auch die gewünschten Ramanlinien verändert und das weitere Verhalten der Probe beeinflusst.

Da die Wechselwirkungsdauer von Ramanstreuung und Fluoreszenz in unterschiedlichen Größenordnungen liegen<sup>56</sup>, gibt es experimentelle Ansätze, die eine Trennung durch gepulste Laser und äußerst kurze Belichtungszeiten der Spektren bewirken<sup>52,57</sup>. Leider sind dafür hohe Pulsintensitäten zur Anregung und eine sehr teure apparative Ausstattung nötig.

Wegen all dieser experimentellen Schwierigkeiten liegt das Hauptaugenmerk hier auf einer mathematische Nachbearbeitung zur Grundlinienkorrektur. In dem Werk von Schulze *et al.*<sup>58</sup> liegt eine Zusammenstellung klassischer Grundlinienkorrekturalgorithmen und ihrer jeweiligen Schwierigkeiten vor. Von Hand angewandte oder vom Menschen unterstützte Methoden lassen sich verständlicherweise nicht zur Bearbeitung einer sehr großen Anzahl von Ramanspektren verwenden - ebenso leidet die Vergleichbarkeit von Spektren, die von unterschiedlichen Menschen bearbeitet worden sind. Einige Algorithmen wie künstliche neuronale Netze oder Polynomanpassung versuchen ein mathematisches Modell des Hintergrundes an die Daten anzupassen, doch da generell nur wenig im Voraus über die eventuell unregelmäßige Form des experimentellen Fluoreszenzhintergrundes bekannt ist, sind Algorithmen vorzuziehen, die ohne ein Modell auskommen. Auch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis kann großen Schwankungen unterworfen sein, so dass statistische Verfahren auf Basis des Rauschens nicht immer angewandt werden können. Algorithmen auf Basis der Ableitung des Spektrums benötigen einen manuell exakt eingestellten Schwellenwert, um Ramanpeaks erkennen zu können, was besonders bei sehr geringem Rauschabstand problematisch ist. Um schwere Artefakte zu vermeiden, benötigen Grundlinienkorrekturalgorithmen auf Basis der Fouriertransformation gut angepasste Filterparameter, welche nur schwer zu bestimmen sind, wenn über das gewünschte Signal nur sehr wenig bekannt ist.

In der vorliegenden Arbeit an Algen sind Ramanspektren entstanden, die aufgrund der geringen Konzentration an ramanaktiven Molekülen in lebendigen Zellen nur ein sehr geringes Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufweisen und mit einem sehr starken, unregelmäßig geformten Fluoreszenzhintergrund belastet sind. Vor allem die variable Form des Fluoreszenzhintergrundes stellt die klassischen Grundlinienkorrekturalgorithmen vor Herausforderungen. Insbesondere bei quantitativen Studien an vielen noch unbekanntenen Proben müssen auch unerwartete, schwache Linien auf jeden Fall bei der Grundlinienkorrektur erhalten bleiben und anschließend vergleichbar sein.

Iterative polynomanpassende Grundlinienkorrekturen wie die in<sup>59</sup> und<sup>60</sup> beschriebenen

Algorithmen stellen sicher, dass im Spektrum vorhandene Ramansignale unter allen Umständen erhalten bleiben und sind eine gute Wahl, wenn die Daten anschließend von einem Menschen gesichtet werden sollen. Da sie jedoch kompliziert geformte Fluoreszenzhintergründe nicht immer vollständig anpassen und entfernen können, werden rein rechnerische Vergleiche in einem großen Datensatz erschwert. Viele weitere Grundlinienkorrekturalgorithmen auf Basis der Polynomanpassung existieren, zum Beispiel mit variabler Ordnung des verwendeten Polynoms<sup>61</sup>. Algorithmen, deren Basis das Erkennen<sup>62</sup> oder Entfernen von Peaks<sup>63</sup> ist, benötigen prinzipbedingt ein klares Kriterium für die Form der Peaks oder erfordern entsprechende statistische Eigenschaften der Daten, welche nicht in jedem Fall gegeben sind (vgl. Abb. 6.8b). Darüber hinaus wurden Algorithmen vorgeschlagen, die auf anspruchsvoller Mathematik wie der Wavelettransformation beruhen<sup>64</sup>, deren Funktionsweise jedoch nicht sonderlich anschaulich ist. Gerade für die praktische Anwendung an unbekanntem Daten ist es wesentlich, dass der Experimentator eine Vorstellung von der Funktionsweise des Grundlinienkorrekturalgorithmus besitzt, um mögliche auftretende Artefakte erkennen und einschätzen zu können.

Eine interessante neue Herangehensweise stellt die Anwendung von morphologischen Operatoren<sup>65</sup> zur Grundlinienkorrektur dar, welche Signale anhand der Breite ihrer Strukturen unterscheiden. Damit werden die freien Parameter dieser morphologischen Operatoren vor allem durch die Abbildungsfunktion des Spektrometers, die natürliche Linienbreite und das Ineinanderlaufen benachbarter Ramanlinien gegeben. Perez-Pueyo *et al.*<sup>65</sup> beschreiben außerdem einen Algorithmus zur automatischen Bestimmung der Strukturbreite, welche der breitesten vorkommenden Linie oder Kombination ineinandergelaufener Linien entspricht. Dieser Algorithmus erlaubt eine vollständig automatische Grundlinienkorrektur, falls die Erkennung der Strukturbreite korrekt funktioniert. Gemäß ihrer mathematischen Definition erhält die rein morphologische Grundlinienkorrektur zwar die Linienpositionen präzise, sie kann jedoch die Form der Flanken der Ramanlinien verändern, was für eine spätere Hauptkomponentenzerlegung problematisch ist.

Der in diesem Kapitel beschriebene Algorithmus wurde von den Arbeiten von Bukvic *et al.*<sup>66</sup> und Perez-Pueyo *et al.*<sup>65</sup> inspiriert. Der erste Ansatz<sup>66</sup> beschreibt einen Algorithmus zur Erkennung der Grundlinie in dem besonderen Fall, dass die allermeisten Punkte im Spektrum eine direkt mathematisch modellierbare Grundlinie darstellen, während nur wenige Punkte zu scharfen Ramanlinien gehören. Er basiert auf der Berechnung von Histogrammen und erkennt die Lage der Grundlinie anhand der Normalverteilung der Rauschamplitude. Zu seinen Stärken zählen Einfachheit, die Möglichkeit, die Lage von Ramanlinien automatisch zu erkennen sowie die Bestimmung eines Fehlerbereiches für die Grundlinie. Er scheitert jedoch, falls die Form der Grundlinie nicht mit einer vorab bekannten mathematischen Funktion angenähert werden kann oder falls anteilmäßig viele Punkte im Spektrum zu den Ramanlinien gehören. Damit ist dieser Algorithmus nicht für die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen *in vivo* Ramanspektren geeignet, dennoch veranschaulicht er gut, dass das Rauschen der Fluoreszenz in einer Grundlinienkorrektur

berücksichtigt werden sollte.

Der zweite Ansatz<sup>65</sup> basiert auf der alleinigen Anwendung morphologischer Operatoren und bietet die Möglichkeit einer vollständigen Automatisierung, führt aber nicht zu einer stetig differenzierbaren Grundlinie und zeigt Schwächen bei der Erkennung der Strukturbreite, falls die Breite ineinandergelaufener Ramanlinien näherungsweise in den Bereich der Strukturbreite des Hintergrundes kommt. Aus diesem Grund wurde zur Grundlinienkorrektur der in dieser Arbeit gemessenen Ramanspektren ein morphologischer Operator mit der Anwendung einer Glättung kombiniert<sup>49</sup>, wobei die Strukturbreite vom Experimentator vorgegeben wird.

Weitere Gemeinsamkeiten hat der hier beschriebene Algorithmus mit der in<sup>63</sup> vorgeschlagenen Herangehensweise, welche auf der iterativen Anwendung eines Savitzky-Golay-Filters basiert, dessen Effekt Ähnlichkeiten mit der hier verwendeten Faltung mit einem Glättungskern besitzt. Damit enden jedoch die Gemeinsamkeiten, da der in<sup>63</sup> beschriebene Algorithmus zuvor die Ramanlinien aus den Spektren entfernt und die Strukturbreite für den Savitzky-Golay-Filter automatisch variiert. Im Gegensatz dazu verwendet der hier beschriebene morphologische Algorithmus eine fest vorgegebene Strukturbreite, so dass sämtliche Spektren auf vergleichbare Art und Weise behandelt werden und der Erfolg der Grundlinienkorrektur nicht von der Form der Grundlinie oder dem tatsächlichen Vorhandensein von Ramanlinien abhängt.

## 6.2 Iterative morphologische Grundlinienkorrektur

Als Vorbereitung zur Grundlinienkorrektur sind defekte Pixel der für die Aufnahme der Spektren verwendeten Kamera zu entfernen, ebenso die spektrale Kante des verwendeten Tiefpass-Kantenfilters. Infolge der durch die zum Entfernen des Rauschens vorab verwendeten Glättung könnten diese scharf begrenzten, intensiven Artefakte sonst die Grundlinie der Messwerte in ihrer direkten Umgebung verzerren. Da die Positionen defekter Pixel und Filterkanten durch den ramanspektroskopischen Aufbau selbst gegeben sind, können sie meist ohne weiteres automatisch entfernt werden.

Die Strukturbreite, welche zum Trennen der Ramanlinien von der Form der Grundlinie verwendet wird, sollte etwas größer gewählt werden als die breiteste im Spektrum vorkommende Ramanlinie, wobei von Fußpunkt zu Fußpunkt in Pixeln gezählt wird. Sehr breite Linien entstehen zum Beispiel durch mehrere, dicht beieinander liegende Ramanlinien, die auf Grund ihrer Linienbreite oder der gewählten Spaltbreite nicht aufgelöst werden können.

Da Ramanspektren typischerweise durch die Art der Aufnahme als Liste diskret abgetasteter Punkte vorliegen, wurden zur Vereinfachung der Algorithmen Pixel anstelle von

Wellenzahlen als Berechnungsgrundlage verwendet. Der Zusammenhang zwischen Wellenzahlen und Pixeln ist bei auf Wellenlängen kalibrierten Spektrometern nicht linear, ändert sich aber typischerweise nur wenig innerhalb des Bereich eines Spektrums von höchstens etwa  $3000 \text{ cm}^{-1}$ . Mit dem hier verwendeten Spektrometer, einem 1200 Linien/mm Gitter und Anregung bei 473 nm ergeben sich beispielsweise  $0,97 \text{ cm}^{-1}$  pro Pixel bei  $0 \text{ cm}^{-1}$  und  $0,71 \text{ cm}^{-1}$  pro Pixel bei  $3000 \text{ cm}^{-1}$ . Außerdem kann die Strukturbreite passend für die breiteste Ramanlinie in dem Bereich mit der besten Auflösung gewählt werden. Sollte die Messung eines sehr großen spektralen Bereiches in Kombination mit sehr schmalen Linien es notwendig machen, kann aber auch eine von den Wellenzahlen abhängige Strukturbreite eingeführt werden.

Für die Grundlinienkorrektur wird ein iterativer Ansatz verwendet, wobei in jedem Schritt eine morphologische Operation in Kombination mit Glättung angewendet wird. Die Glättung wird für zwei unterschiedliche Zwecke verwendet: Zunächst wird das Rauschen reduziert, anschließend wird die morphologisch bestimmte Grundlinie geglättet. In beiden Fällen werden die spektralen Intensitätsdaten  $I[x]$  zur Pixelnummer  $x$  mit einem Glättungskern

$$m(x) = \begin{cases} \exp\left(\frac{-1}{1-x^2}\right) & \text{bei } |x| < 1 \\ 0 & \text{sonst.} \end{cases} \quad (6.1)$$

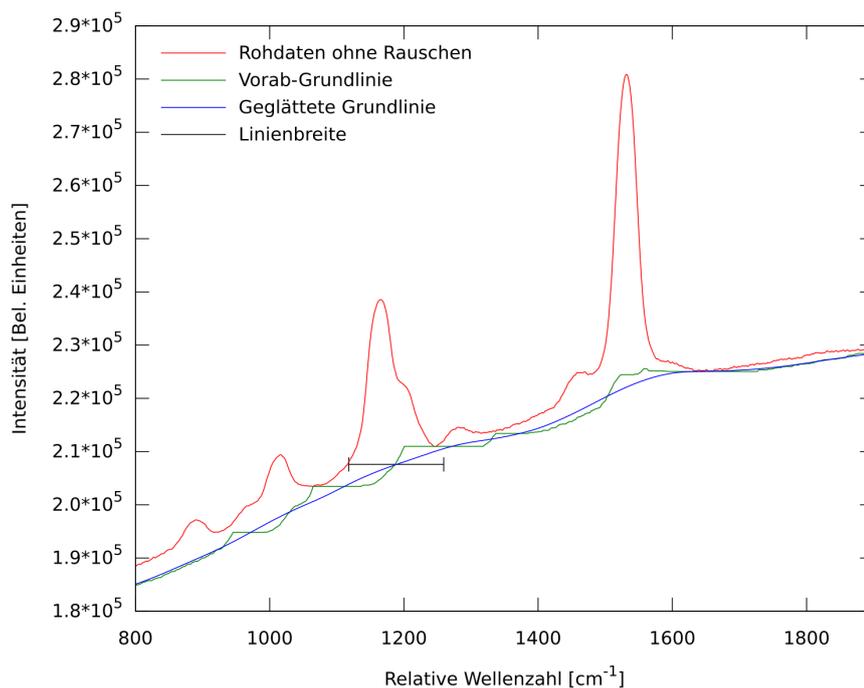
gefaltet

$$I_{\text{glatt}}[x] = \frac{\sum_{k=1}^n I[k] * m\left(\frac{x-k}{w}\right)}{\sum_{k=1}^n m\left(\frac{x-k}{w}\right)} \quad (6.2)$$

wobei  $k$  über alle Pixel  $n$  des Datensatzes läuft und  $w$  die Strukturbreite des Glättungskernes angibt.

Zunächst wird diese Glättung auf die Rohdaten angewendet, um das Rauschen zu verringern. Hierzu sollte  $w$  für das Rauschen des Spektrometers passend gewählt werden, typischerweise in der Größenordnung einiger Pixel. An den Grenzen des Spektrums läuft der Glättungskern teilweise ins Leere und muss dann renormalisiert werden, was im Nenner geschieht.

Anschließend wird eine Vorab-Grundlinie mit Hilfe einer morphologischen Operation bestimmt, indem jeweils die kleinste Intensität innerhalb der Strukturbreite aus dem vom Rauschen befreiten Datensatz gewählt wird. Somit bestimmt der Pixel mit der geringsten Intensität innerhalb der halben Strukturbreite nach Rechts oder der halben Strukturbreite nach Links die Intensität des Pixels in der morphologischen Vorab-Grundlinie. Dies lässt sich mit einer waagrecht von unten in den Datensatz gedrückten Gerade veranschaulichen, deren Länge der Strukturbreite entspricht. Somit kann die morphologische Vorab-Grundlinie niemals oberhalb des Datensatzes liegen und dringt bei einer passend gewählten Strukturbreite auch nicht in Ramanlinien ein, was in Abb. 6.1 veranschaulicht wird.



**Abbildung 6.1:** In jedem Iterationsschritt wird die morphologische Vorab-Grundlinie bestimmt, in dem die kleinste Intensität innerhalb der Strukturbreite (hier 180 Pixel) gewählt wird. Eine Glättung der morphologischen Vorab-Grundlinie ergibt eine Näherung der echten Grundlinie, die anschließend abgezogen wird. Das Spektrum ist von Probe (1) (vgl. Abb. 6.4).

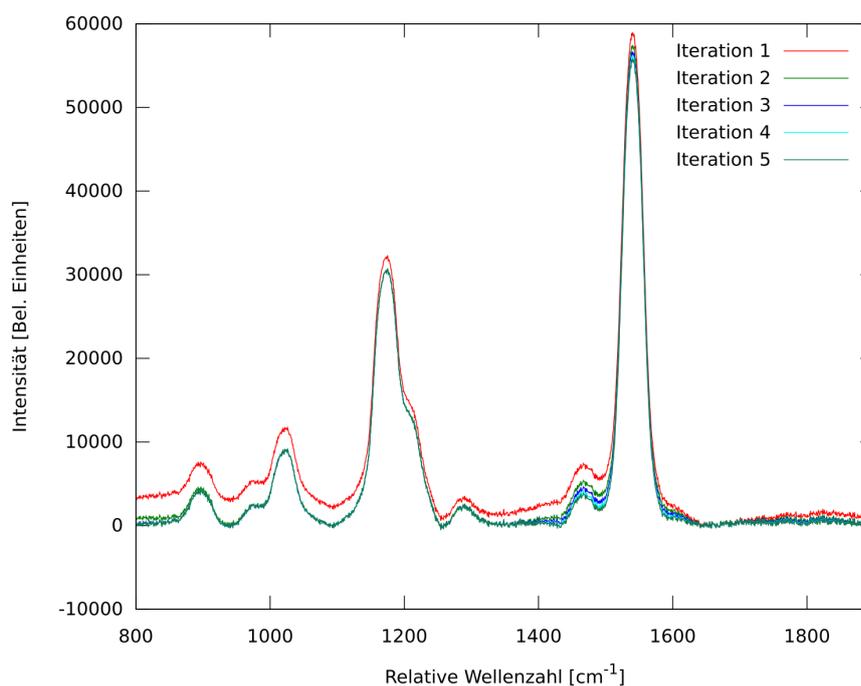
Die raue und Sprünge enthaltene morphologische Vorab-Grundlinie wird anschließend noch einmal geglättet, wobei der bereits beschriebene Glättungskern mit  $w$  gleich der gewählten Strukturbreite zum Einsatz kommt. Dies ergibt eine Näherung an die echte Grundlinie, deren Intensität in den meisten Fällen kleiner oder gleich der gemessenen Intensitäten ist und welche die enthaltenen Ramanlinien nicht beeinflusst.

Schließlich wird die Differenz der rauschbehafteten Originaldaten und der geglätteten Näherung der Grundlinie (vgl. Abb. 6.1) bestimmt, um die Form des Rauschens originalgetreu beizubehalten.

Der gesamte Algorithmus wird mit der Differenz anstelle der Originaldaten iteriert und liefert im letzten Iterationsschritt die endgültige Grundlinie bzw. das fertig grundlinienkorrigierte Spektrum. In Abb. 6.2 sind die ersten fünf Iterationsschritte der Grundlinienkorrektur zu sehen.

Für eine übersichtliche Veranschaulichung der einzelnen Bearbeitungsschritte gibt es das Flussdiagramm in Abb. 6.3. Meine Implementierung dieses Algorithmus in Pascal sowie eine weitere, von Christian Suhr geschriebene Implementierung für Octave oder Matlab wurden als freie Software veröffentlicht<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Verfügbar unter <http://ramanbaseline.sourceforge.net/> (Letzter Zugriff am 26. Januar 2018)



**Abbildung 6.2:** Konvergenz der ersten fünf Iterationsschritte. Die Originaldaten sind in Abb. 6.1 zu sehen.

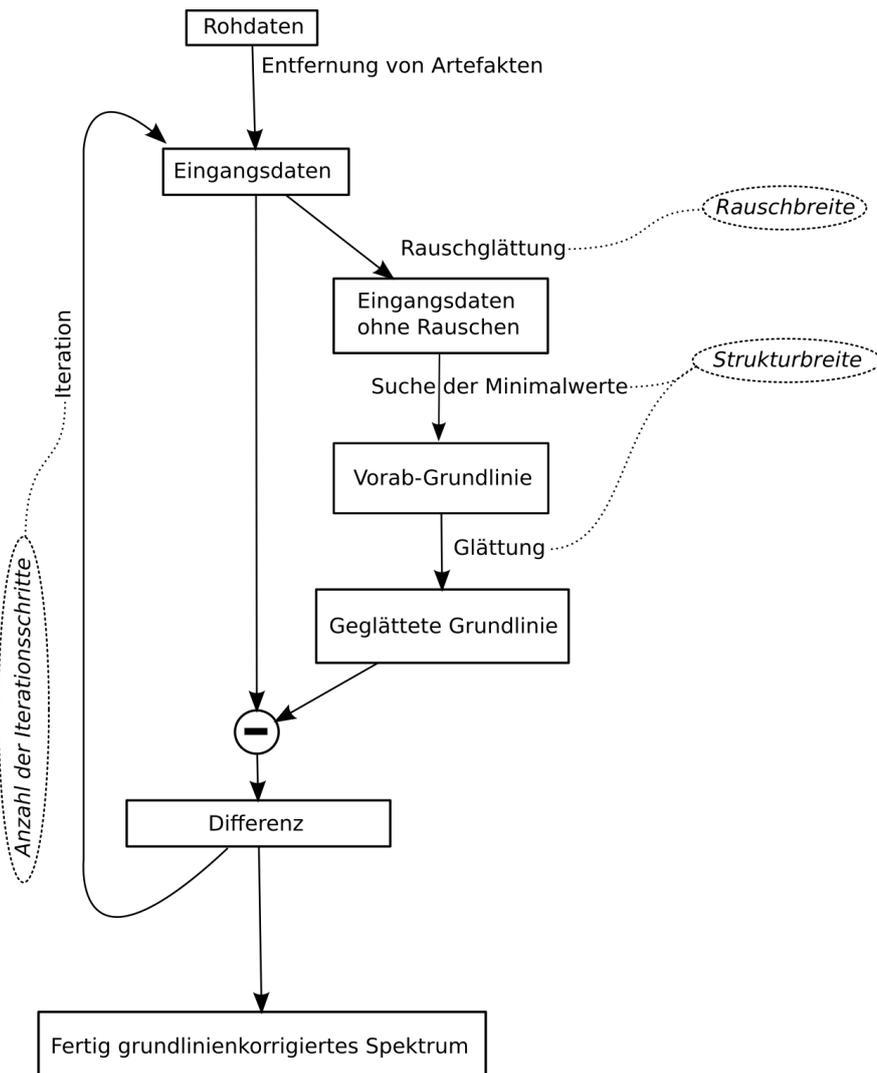
## 6.3 Referenzmessungen zur Demonstration

Um den soeben beschriebenen Algorithmus unter kontrollierten Bedingungen zu erproben und mit anderen Algorithmen zur Grundlinienkorrektur vergleichen zu können, wurden vier Referenzproben<sup>j</sup> aus Ethanol (Carl Roth  $\geq 99,8\%$ ),  $\beta$ -Carotin (Sigma-Aldrich  $> 97,0\%$ ) und unterschiedlichen Mengen stark fluoreszierender roter Tinte (Lamy), die dem Absorptionsspektrum nach vermutlich Eosin enthält, angesetzt, indem jeweils  $30\ \mu\text{g}$   $\beta$ -Carotin in 3 ml Ethanol gelöst und unterschiedliche Mengen an Tinte hinzugegeben wurden: Probe (1) enthält keine Tinte, Probe (2)  $0,4\ \mu\text{l}$  Tinte, Probe (3)  $1,6\ \mu\text{l}$  Tinte und Probe (4)  $8,0\ \mu\text{l}$  Tinte.

Die Ramanspektren wurden mit dem 473 nm Dauerstrichlaser und dem 1200 Linien/mm Gitter bei  $20\ \mu\text{m}$  Spaltbreite mit jeweils insgesamt 5 s Belichtungszeit aufgenommen.

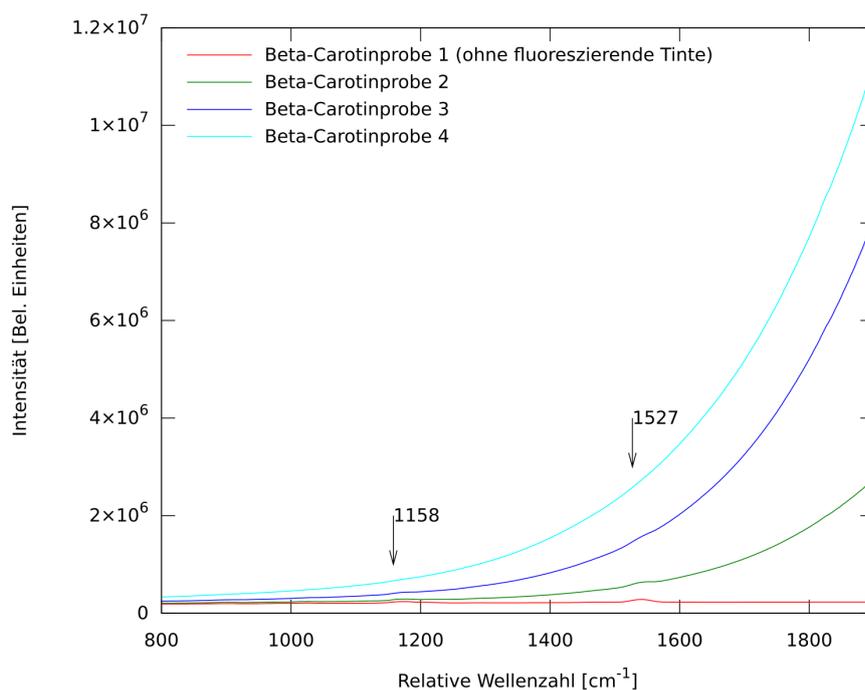
Der gesamte spektrale Bereich der Rohdaten von  $592\ \text{cm}^{-1}$  bis  $2161\ \text{cm}^{-1}$  wurde für die Berechnungen verwendet, da die Ergebnisse von Grundlinienkorrekturalgorithmen auch von dem zur Verfügung stehenden spektralen Bereich abhängen. Gezeigt wird hier jedoch der Anschaulichkeit halber nur der Bereich von  $800\ \text{cm}^{-1}$  bis  $1900\ \text{cm}^{-1}$  (Abb. 6.4), da außerhalb dieses Bereiches keine Ramanlinien erkennbar waren. Die Stärke der Fluoreszenz steigt von Probe (1) bis Probe (4) mit zunehmender Tintenkonzentration in

<sup>j</sup>Vielen Dank an Christian Suhr für das Ansetzen der vier Referenzproben.



**Abbildung 6.3:** Flussdiagramm zur Veranschaulichung der einzelnen Bearbeitungsschritte während der Grundlinienkorrektur.

der  $\beta$ -Carotininlösung. Die beiden stärksten Ramanlinien von  $\beta$ -Carotin bei  $1158\text{ cm}^{-1}$  und  $1527\text{ cm}^{-1}$  sind in dem Spektrum von Probe (1) gut zu erkennen, wenngleich sie auf Grund der Skalierung der Abb. 6.4 schwach wirken. Mit zunehmendem Fluoreszenzhintergrund werden sie schwerer zu erkennen.

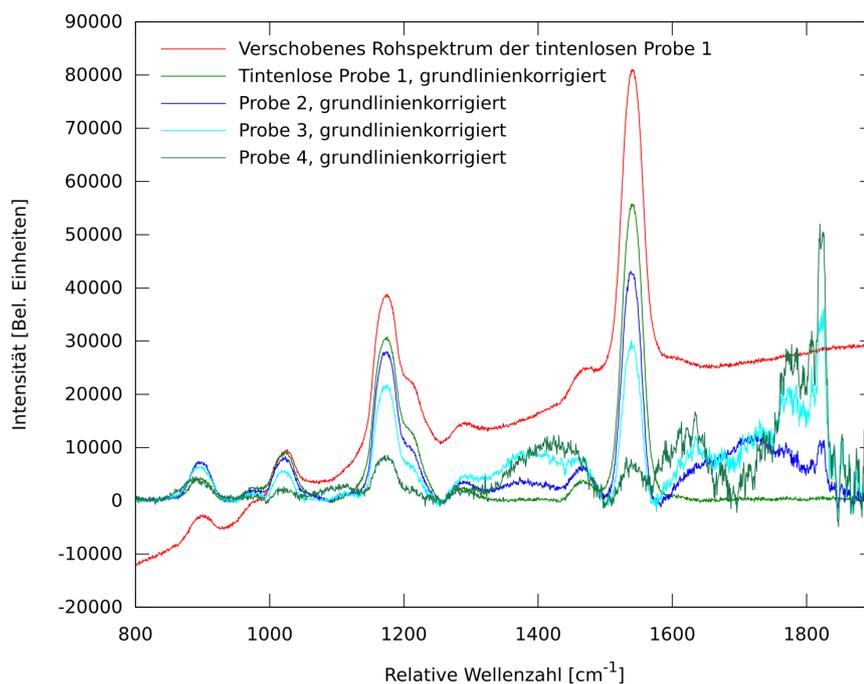


**Abbildung 6.4:** Unbearbeitete Ramanspektren von vier Proben einer  $\beta$ -Carotininlösung mit unterschiedlichen Mengen an roter, stark fluoreszierender Tinte zur Erprobung des neuen Grundlinienkorrekturalgorithmus.

## 6.4 Korrigierte Spektren

Alle vier Ramanspektren der mit unterschiedlichen Mengen von fluoreszierender Tinte versetzten  $\beta$ -Carotininlösung in Ethanol (Abb. 6.4) wurden mit dem neu entwickelten Algorithmus grundlinienkorrigiert (Abb. 6.5). Passend zum Rauschen der Rohdaten wurde die Breite der Rauschglättung auf 6 Pixel gesetzt. Die Strukturbreite wurde anhand der breitesten in den Daten vorkommenden Ramanlinie, derjenigen bei  $1158 \text{ cm}^{-1}$ , auf 180 Pixel gesetzt. Standardmäßig wurden fünf Iterationsschritte verwendet, was im nächsten Abschnitt noch näher erläutert wird.

Beim Vergleich des gemessenen und des grundlinienkorrigierten Spektrums der tintenlosen Probe (1) wurden sowohl die Intensitäten als auch die Linienlagen korrekt wiedergegeben. Ein Vergleich dieses Ramanspektrums von  $\beta$ -Carotin mit den grundlinienkorrigierten Spektren der Proben (2), (3) und (4) zeigt, dass die Linienlagen erhalten bleiben, die beobachtete Intensität der Ramanlinien aber trotz gleicher Menge von  $\beta$ -Carotin mit steigender Tintenkonzentration abnimmt. Dies kommt daher, dass der Anregungsstrahl von der Tinte absorbiert wird und so im Vergleich zu der tintenlosen Probe ein kleineres Volumen bestrahlt wird. Ebenso werden auch die Ramanlinien selbst von der Tinte reabsorbiert. Deshalb kann nicht von einer einfachen Superposition der Signale ausgegangen werden, wenn  $\beta$ -Carotin mit fluoreszierender Tinte gemischt wird. Darüber hinaus führt

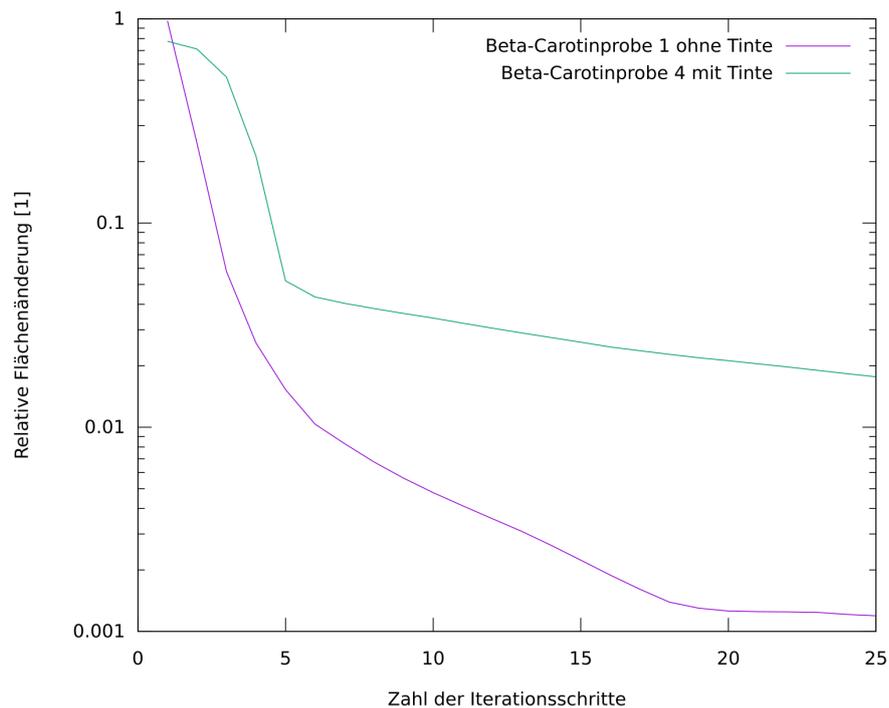


**Abbildung 6.5:** Die Ramanspektren aus Abb. 6.4 nach Anwendung der hier beschriebenen morphologischen Grundlinienkorrektur mit jeweils fünf Iterationsschritten. Das nach unten verschobene Rohspektrum der tintenlosen Probe (1) wurde hier zum Vergleich mit eingezeichnet (rot). In allen Spektren sind die Ramanlinien von  $\beta$ -Carotin zu erkennen. Die Signale bei  $1400\text{ cm}^{-1}$  und oberhalb von  $1600\text{ cm}^{-1}$  sind nicht näher identifizierte Komponenten der verwendeten roten Tinte.

die starke Fluoreszenz zu einem erhöhten Rauschen. Insbesondere Probe (4) hat ein sehr geringes Signal-zu-Rausch-Verhältnis, dennoch können die beiden stärksten Ramanlinien von  $\beta$ -Carotin bei  $1158\text{ cm}^{-1}$  und  $1527\text{ cm}^{-1}$  nach der Grundlinienkorrektur erkannt werden. Ein derart verrauschtes Spektrum würde normalerweise verworfen werden; die Möglichkeit, auch solche Daten erfolgreich bearbeiten zu können spielt jedoch eine wichtige Rolle bei der Bestimmung von absoluten Konzentrationen im Laufe einer Reaktion oder bei der Suche nach geringfügigen Verunreinigungen mit bereits bekannten Substanzen.

## 6.5 Bestimmung der nötigen Anzahl von Iterationsschritten

Für die erfolgreiche Anwendung eines iterativen Algorithmus muss die optimale Anzahl von Iterationsschritten bestimmt werden. Da jeder Iterationsschritt Rechenzeit kostet, ist eine kleine Anzahl von Iterationsschritten wünschenswert. Darüber hinaus hat jede



**Abbildung 6.6:** Relative Flächenänderung jeweils zwei aufeinanderfolgender Iterationsschritte in Bezug auf die Fläche unter dem ursprünglichen Spektrum aufgetragen gegen die Zahl der Iterationsschritte bei Anwendung der Grundlinienkorrektur auf die tintenlose Probe mit nur schwacher Fluoreszenz (1) und auf die stark fluoreszierende Probe (4).

Art der mehrmals iterativ angewandten Glättung die Eigenschaft, Datenwerte Schritt für Schritt über das gesamte Spektrum zu “verschmieren”, so dass keine Konvergenz oder stationäre Lösung zu erwarten ist. Dieses Problem wird auch bei Schulze *et al.*<sup>63</sup> angesprochen, worin ein Savitzky-Golay-Filter zur Anwendung kommt. Bei einer großen Anzahl von Iterationsschritten ist also auf Grund der Eigenschaften der Glättung mit dem Auftreten von Artefakten zu rechnen, ganz im Gegensatz zu einer einfachen polynomanpassenden Grundlinienkorrektur, welche bei geeigneten Randbedingungen konvergiert und numerisch stabil ist.

Die ersten fünf Iterationsschritte an Probe (1) sind in Abb. 6.2 aufgetragen und veranschaulichen bereits, dass fünf Iterationsschritte ausreichen sollten. Um diese Vermutung zu belegen, zeigt Abb. 6.6 die relative Flächenänderung zwischen je zwei aufeinanderfolgenden Iterationsschritten an den beiden Proben (1) und (4). Die Flächenänderung sinkt rascher bei der tintenlosen Probe (1) als bei der stark fluoreszierenden Probe (4), jedoch erreichen beide Spektren relative Flächenänderungen von unter 5% per Iterationsschritt nach bereits fünf Iterationsschritten, die deshalb als Standardwert gewählt werden und Rechenzeiten von unter einer Sekunde pro Spektrum ermöglichen.

Für besondere Fälle kann die optimale Anzahl von Iterationsschritten experimentell ermittelt werden, indem die Zahl der Iterationsschritte so lange erhöht wird, bis sich die

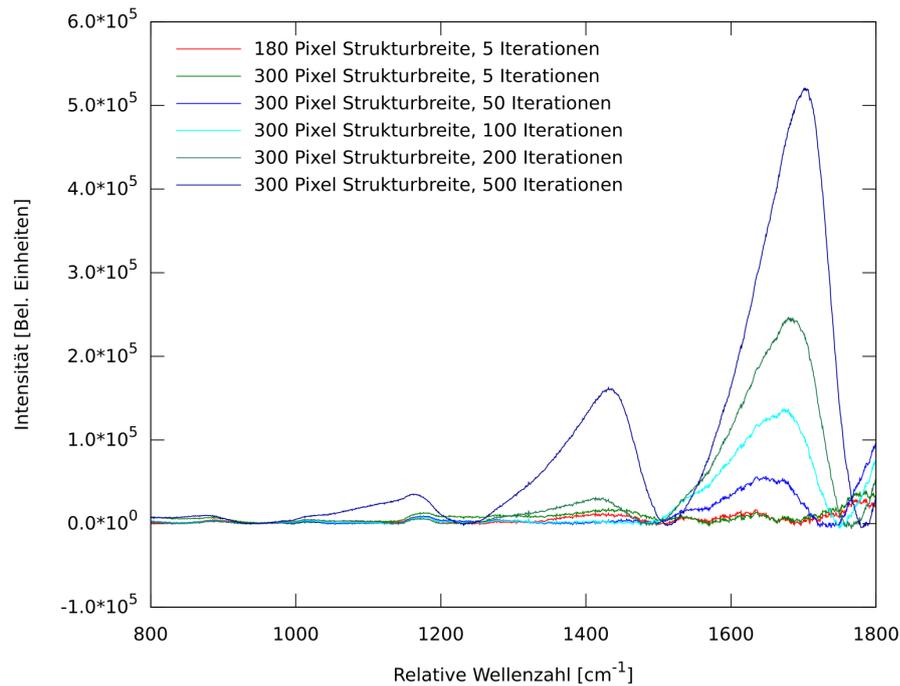
grundlinienkorrigierten Spektren im Rahmen der gewünschten Genauigkeit nicht mehr verändern. Dennoch sollte die Zahl der Iterationsschritte in der gleichen Größenordnung wie der empfohlene Standardwert von fünf Durchläufen bleiben, um das Auftreten von Artefakten zu vermeiden.

## 6.6 Mögliche Artefakte des beschriebenen Algorithmus

Wird die Strukturbreite zu gering gewählt, werden Teile der Linien in dem zu bearbeitenden Ramanspektrum fälschlicherweise als zur Grundlinie gehörig erkannt und entfernt. Liegen die einzelnen Linien separat, kann dies leicht vermieden werden. Liegen jedoch mehrere Linien im Spektrum so nahe beieinander, dass sie an der Basis ineinanderlaufen, so muss die Strukturbreite mit Bedacht passend gewählt werden. Ebenso wird keine gute Grundlinienkorrektur erreicht, wenn die Strukturbreite so groß gewählt wird, dass die Suche nach den Minimalwerten nicht mehr dem Verlauf der tatsächlichen Grundlinie folgen kann. Die optimale Einstellung für die Strukturbreite, welche die schmalsten Formen der Grundlinie von den breitesten ineinandergelaufenen Ramanlinien trennen kann, hängt von den jeweiligen experimentellen Bedingungen ab und wird maßgeblich von der Auflösung, der Spaltbreite und der auftretenden natürlichen Linienbreite der gemessenen Substanzen beeinflusst. Anschaulich betrachtet sollte die Strukturbreite für die Grundlinienkorrektur etwas größer gewählt werden als der Fußpunkt-zu-Fußpunkt-Abstand der breitesten ineinandergelaufenen Ansammlung von Ramanlinien. Die eigene Erfahrung zeigt, dass die einmal für einen festgelegten experimentellen Aufbau bestimmten typischen Einstellungen der Grundlinienkorrektur für viele verschiedene Proben unverändert übernommen werden können.

Darüber hinaus können sehr steile Flanken ohne Ramanlinien an den Enden des Spektrums durch die Grundlinienkorrektur in intensive Peaks verwandelt werden (hier nicht gezeigt). Dies kommt daher, dass der Algorithmus nicht unterscheiden kann, ob es sich dabei um einen Peak genau am Ende des Spektrums handelt oder um eine steil ansteigende Flanke der Grundlinie selbst. Prinzipiell kann der Algorithmus keine Krümmungen bearbeiten, die weniger als die Hälfte der gewählten Strukturbreite von den Enden des Spektrums entfernt sind.

Da die relative Flächenänderung bei einer zunehmenden Zahl von Iterationsschritten nicht gegen Null konvergiert, ist das Auftreten rechnerischer Artefakte zu erwarten. Obwohl manchmal die Spektren stark fluoreszierender Proben nicht näher identifizierbare Formen wie jene um  $1400\text{ cm}^{-1}$  und oberhalb von  $1600\text{ cm}^{-1}$  in Abb. 6.5 enthalten, können derartige Signale auch als Artefakte künstlich entstehen, falls die Zahl der Iterationsschritte sehr groß gewählt wird. Um dies zu veranschaulichen zeigt Abb. 6.7 den Effekt sehr großer Anzahlen von Iterationsschritten, welcher durch zu groß gewählte Strukturbreiten noch zusätzlich verstärkt wird.



**Abbildung 6.7:** Artefakte, die bei einer wachsenden Anzahl von Iterationsschritten bei der Grundlinienkorrektur an Probe (4) auftreten. In Abb. 6.5 ist das Ergebnis der Grundlinienkorrektur bei passend gewählten Einstellungen zu sehen.

Insbesondere wachsen die spektralen Formen um  $1100\text{ cm}^{-1}$ ,  $1400\text{ cm}^{-1}$  und  $1700\text{ cm}^{-1}$  künstlich mit einer zunehmenden Zahl von Iterationsschritten. Dies geschieht, wenn die gewählte Strukturbreite zwar groß gewählt wurde, es aber eine Form im Spektrum gibt, die noch geringfügig breiter ist. In diesem Fall wird die Suche nach den Minimalwerten bei der Bestimmung der morphologischen Vorab-Grundlinie mittig in jene Form eindringen, so dass nach der Glättung die Werte in einer Art verschmieren, dass die geglättete Grundlinie an den Kanten der Form eine etwas höhere Intensität besitzt als die ursprünglichen Daten für diesen Iterationsschritt selbst. Bei der Differenzbildung entstehen so Bereiche mit negativen Werten, die schließlich die Artefakte wachsen lassen, wenn die Differenzkurve von den Daten abgezogen wird. Pro Iterationsschritt kommen so nur winzige Flächen hinzu, die sich allerdings bei einer großen Zahl von Iterationsschritten aufsummieren und das resultierende Spektrum unbrauchbar machen können.

## 6.7 Vergleich mit anderen Grundlinienkorrekturalgorithmen

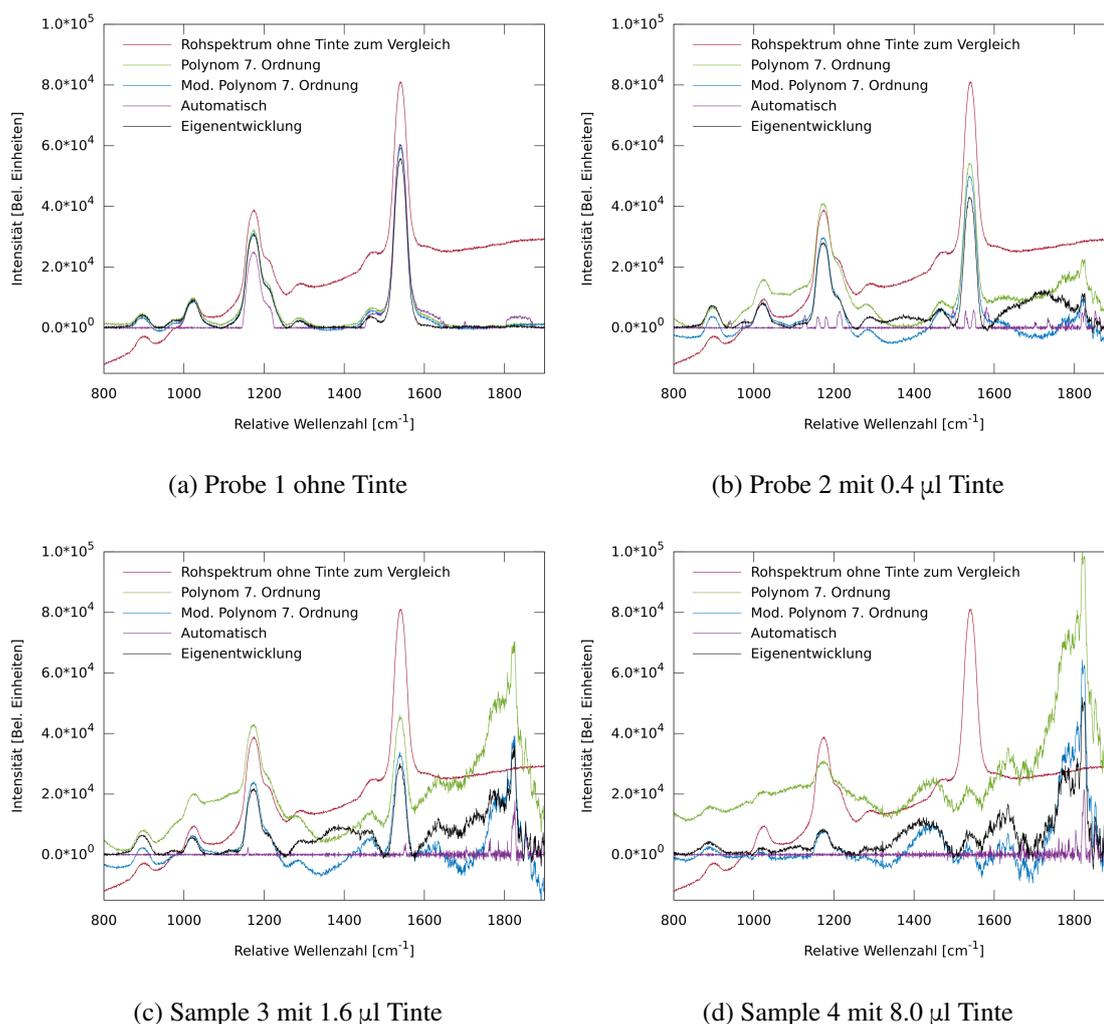
Um die Nützlichkeit des neuen morphologischen Algorithmus zu demonstrieren, wurden auf die Referenzproben drei weitere Grundlinienkorrekturalgorithmen aus der Literatur

angewandt, für die Implementierungen verfügbar waren: Die iterative polynomanpassende Grundlinienkorrektur<sup>59</sup> sowie eine insbesondere für die Fluoreszenz von Gewebe modifizierte Variante davon<sup>60</sup> sind als Teil der "Biodata toolbox"<sup>67</sup> verfügbar. Eine Implementierung des automatischen Grundlinienkorrekturalgorithmus<sup>63</sup> wurde freundlicherweise von den Autoren zur Verfügung gestellt. Die beiden polynomanpassenden Grundlinienkorrekturen wurden mit einem Polynom der siebten Ordnung verwendet, der automatische Algorithmus ohne weitere Einstellungen und der hier beschriebene, morphologische Grundlinienkorrekturalgorithmus mit den Standardeinstellungen einer Rauschbreite von 6 Pixeln, fünf Iterationsschritten und einer manuell gewählten Strukturbreite von 180 Pixeln. Die polynomanpassenden Grundlinienkorrekturen wurden zuvor auch mit Polynomen dritter bis neunter Ordnung erprobt, wobei sich die Qualität der Anpassung mit der Ordnung von drei bis sieben verbesserte. Ab achter Ordnung trat Überschwingen auf, weswegen für diesen Vergleich Polynome siebter Ordnung gewählt wurden.

Das Spektrum der tintenlosen Probe (1) (Abb. 6.8a) konnte sowohl von dem hier beschriebenen morphologischen Algorithmus als auch von den beiden polynomanpassenden Grundlinienkorrekturen gut bearbeitet werden. Schwierigkeiten traten nur bei der automatischen Grundlinienkorrektur auf, welche die Peaks bei  $900\text{ cm}^{-1}$ ,  $1050\text{ cm}^{-1}$  und  $1280\text{ cm}^{-1}$  komplett entfernt und ein Plateau bei  $1850\text{ cm}^{-1}$  eingefügt hat, welches in den Rohdaten so nicht vorhanden ist.

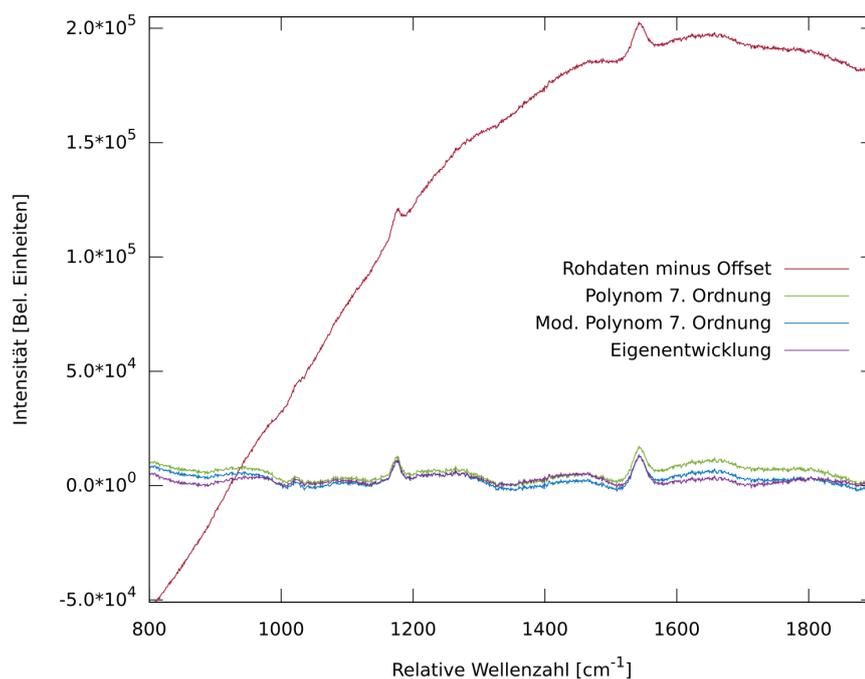
Bei der  $0,4\text{ }\mu\text{l}$  Tinte enthaltenden Probe (2) (Abb. 6.8b) beginnen beide polynomanpassenden Grundlinienkorrekturen einen leicht schlängelnden Verlauf zu zeigen, was auf die unregelmäßige Form des Fluoreszenzhintergrundes zurückzuführen ist, welcher nicht vollständig mit einem Polynom siebter Ordnung angenähert werden kann. Polynome achter und neunter Ordnung wurden erprobt, zeigten aber durch Überschwingen noch schlechtere Ergebnisse. Die automatische Grundlinienkorrektur entfernt weiterhin die Signale bei  $900\text{ cm}^{-1}$ ,  $1050\text{ cm}^{-1}$  und  $1280\text{ cm}^{-1}$  und verwandelt zusätzlich die beiden starken Ramanlinien von  $\beta$ -Carotin bei  $1158\text{ cm}^{-1}$  und  $1527\text{ cm}^{-1}$  in jeweils vier kleine, separate Peaks. Der hier beschriebene morphologische Algorithmus führt zu einer fast flachen Grundlinie, wobei alle vorhandenen Signale erhalten bleiben. Alle Algorithmen zeigen ein buckelförmiges Artefakt bei  $1700\text{ cm}^{-1}$ . Wie bereits diskutiert, ist die Intensität der Ramanlinien kleiner als bei Probe (1).

Bei der  $1,6\text{ }\mu\text{l}$  Tinte enthaltenden Probe (3) (Abb. 6.8c) gibt die automatische Grundlinienkorrektur gar keine der tatsächlich vorhandenen Ramanlinien mehr wieder. Die polynomanpassenden Grundlinienkorrekturen erhalten die vorhandenen Signale auf einer immer mehr schlängelnden Grundlinie, wobei die modifizierte polynomanpassende Grundlinienkorrektur ein etwas besseres Ergebnis erzielt. Der hier beschriebene morphologische Algorithmus erreicht immer noch eine näherungsweise flache Grundlinie, auf der sämtliche Signale enthalten sind. Oberhalb von  $1700\text{ cm}^{-1}$  nehmen die Artefakte für alle Algorithmen zu.



**Abbildung 6.8:** Vergleich vier verschiedener Grundlinienkorrekturalgorithmen. Das unbearbeitete, nach unten verschobene Spektrum der tintenlosen Probe 1 wurde in Rot als Referenz für das Ramanpektrum von  $\beta$ -Carotin mit eingefügt. Zu sehen sind die Ergebnisse der polynomanpassenden Grundlinienkorrektur<sup>59</sup> (grün), der modifizierten polynomanpassenden Grundlinienkorrektur<sup>60</sup> (blau), der automatischen Grundlinienkorrektur<sup>63</sup> (violett) sowie der hier beschriebenen morphologischen Grundlinienkorrektur (schwarz).

Bei der sehr stark fluoreszierenden Probe (4) mit 8,0 µl Tinte (Abb. 6.8d) bleiben auf Grund der starken Absorption der Tinte nur noch sehr schwache Ramanlinien übrig. Die automatische Grundlinienkorrektur zeigt keine Ramanlinien, dafür wird ein scharfes Artefakt bei  $1820\text{ cm}^{-1}$  wiedergegeben. Beide polynomanpassenden Grundlinienkorrekturalgorithmen ergeben eine ähnliche Form und erhalten alle Signale, wobei die modifizierte polynomanpassende Grundlinienkorrektur wiederum ein etwas besseres Ergebnis erzielt. Der hier beschriebene morphologische Algorithmus erreicht immer noch eine annähernd flache Grundlinie und erhält alle Signale, obwohl ein Spektrum mit so niedrigem Signal-zu-Rauschverhältnis in den meisten Fällen verworfen werden würde.



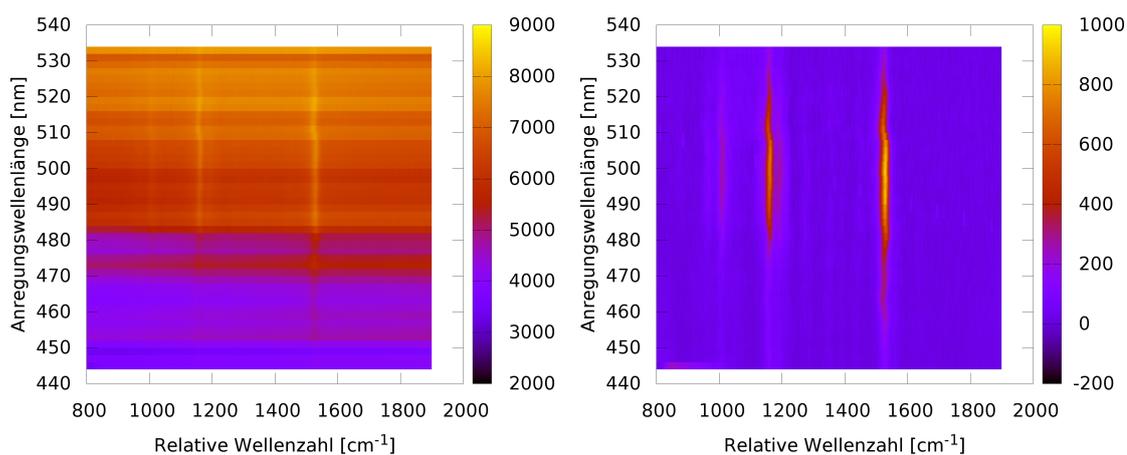
**Abbildung 6.9:** Vergleich der Ergebnisse dreier Grundlinienkorrekturalgorithmen an einem Carotinoid-Ramanspektrum eines menschlichen Fingers. Die gemessenen Rohdaten abzüglich eines Intensitätsoffsets sind zu Vergleichszwecken in Rot eingezeichnet. Das Ergebnis der polynom-anpassenden Grundlinienkorrektur<sup>59</sup> ist in Grün dargestellt, der modifizierten polynom-anpassenden Grundlinienkorrektur<sup>60</sup> in Blau sowie der hier beschriebenen morphologischen Grundlinienkorrektur in Violett.

## 6.8 Anwendung der Grundlinienkorrektur auf *in vivo* Ramanspektren

Carotinoide wie  $\beta$ -Carotin sind auch in der menschlichen Haut enthalten<sup>68</sup> - so lag es nahe, zur Veranschaulichung ein *in vivo* Ramanspektrum meines Zeigefingers aufzunehmen (Abb. 6.9). Die Aufnahmebedingungen sind wie für die Proben (1) bis (4), jedoch wurde die Spaltbreite auf 10  $\mu\text{m}$  verringert. Das Ergebnis der automatischen Grundlinienkorrektur wurde weggelassen, da dessen ausgeprägten Artefakte die Übersichtlichkeit der Abbildung 6.9 beeinträchtigt hätten. Alle drei gezeigten Algorithmen liefern ein ähnliches Ergebnis, wobei der hier beschriebene morphologische Algorithmus die flachste Grundlinie erreicht.

Auf Resonanzkarten soll später noch einmal eingegangen werden (siehe Kap. 9), an dieser Stelle sei nur hervorgehoben, dass es sich dabei um eine übersichtliche Zusammenstellung mehrerer Ramanspektren mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen handelt. Eine Gegenüberstellung einer Resonanzkarte von *Haematococcus pluvialis* (vgl. Abb. 10.3a) vor und nach der Grundlinienkorrektur ist in Abb. 6.10 zu sehen. Obwohl die ein-

zelenen Ramanspektren unterschiedliche Fluoreszenzhintergründe besitzen (Abb. 6.10a), ist nach Grundlinienkorrektur mit dem hier beschriebenen Algorithmus ein gleichmäßiger und sprungloser Verlauf der Intensität der Ramanlinien über die Anregungswellenlängen hinweg zu beobachten (Abb. 6.10b). Ein weiteres Beispiel für mit dem hier beschriebenen morphologischen Algorithmus grundlinienkorrigierte Resonanzkarten wurde von Meinhardt-Wollweber *et. al.* publiziert<sup>68</sup>.



(a) Mit Fluoreszenz

(b) Grundlinienkorrigiert

**Abbildung 6.10:** Grundlinienkorrektur einer Resonanzkarte von *Haematococcus pluvialis* (vgl. Abb. 10.3a) mit dem hier beschriebenen morphologischen Algorithmus. Die “Schlangenlinien” sind kein Artefakt der Grundlinienkorrektur, sondern auf ein mechanisches Problem mit dem Spektrometer zurückzuführen, welches in Kap. 9 noch einmal näher betrachtet wird.



# Kapitel 7

## Algenarten, Kulturbedingungen und Entwicklung eines Bioreaktors

### 7.1 Verwendete Algenarten

Vier verschiedene Algenarten aus der Göttinger Sammlung von Algenkulturen, *Chlorella vulgaris* (SAG 211-11b), *Haematococcus pluvialis* (SAG 34-1a), *Dunaliella salina* (SAG 184.80) und *Porphyridium purpureum* (SAG 1380-1a), deren besonderen Eigenschaften und Fähigkeiten in diesem Kapitel vorgestellt werden sollen, wurden für alle gezeigten Experimente zur Detektion von Carotinoiden verwendet. Startkulturen auf Gelmedium sind wie in Abb. 7.1 gezeigt mit der Post aus Göttingen gekommen.

*Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis* und *Dunaliella salina* besitzen als Grünalgen den Violaxanthinzyklus<sup>69</sup>. Außer Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin<sup>69</sup> ist ein hoher Gehalt an  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin, Neoxanthin und Lutein zu erwarten<sup>42</sup>. *Porphyridium purpureum* als Rotalge zum Vergleich hat keinen Violaxanthinzyklus und enthält nur  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin<sup>42</sup>.

### 7.2 *Chlorella vulgaris*

*Chlorella vulgaris* ist eine sehr weit verbreitete Grünalge, die weltweit in Süßwasserhabitaten vorkommt, sofern die Temperatur es zulässt. Für die ramanspektroskopische Suche nach dem Violaxanthinzyklus unter Verwendung von Resonanzkarten ist *Chlorella vulgaris* besonders interessant, da sie sehr robust ist und unter allen möglichen Bedingungen wächst, jedoch auch unter Stress nicht in der Lage ist, schnell sekundäre Carotinoide zu synthetisieren<sup>70</sup>.



**Abbildung 7.1:** Stämme aus der Göttinger Sammlung von Algenkulturen werden in dieser Form mit der Post auf Gelmedium geliefert und können anschließend in flüssiges Medium übertragen werden. Der Stamm SAG 1380-1c von *Porphyridium purpureum* ist allerdings eingegangen, so dass für diese Arbeit stattdessen der Stamm SAG 1380-1a verwendet worden ist. Zusätzlich wurde *Dunaliella salina* (SAG 184.80) verwendet.

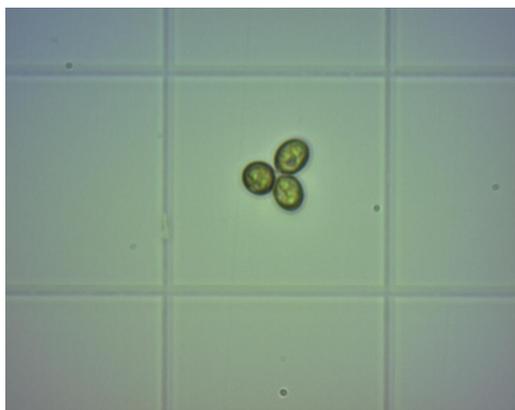
Ihre hauptsächliche kommerzielle Anwendung findet sich im Bereich der Herstellung von Lipiden<sup>71</sup> für Biokraftstoffe<sup>72</sup>. Da sich jedoch die Synthesewege von Lipiden<sup>73</sup> und Carotinoiden<sup>74</sup> unterscheiden und diese jeweils an verschiedenen Stellen in der Zelle eingelagert werden<sup>75</sup>, ist eine Beeinflussung der Ramanmessung an Carotinoiden durch die Lipidsynthese unwahrscheinlich, zudem die Ramanspektren von Lipiden<sup>76</sup> ganz anders aussehen als die von Carotinoiden und damit leicht erkannt werden können, falls sie auftreten.

### 7.3 *Haematococcus pluvialis*

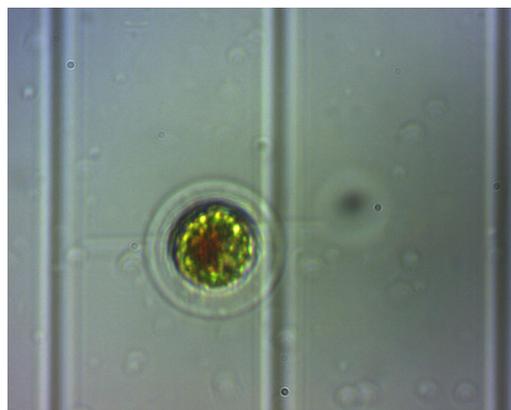
Die Grünalge *Haematococcus pluvialis* (Abb. 7.2a) ist vor allem für ihre Fähigkeit bekannt, unter Stress große Mengen von Astaxanthin zu synthetisieren (Abb. 7.2b), welches

sich wie ein Schutzschild in der Zellwand ansammelt (Abb. 7.2c)<sup>15</sup>. Astaxanthin, welches auch für die Färbung von Flamingofedern verantwortlich ist, kann in den unter Stress korallenrot aussehenden, runden Algenzellen bis zu 99 % des gesamten Carotinoidgehaltes ausmachen<sup>77</sup>. In diesem Zustand überstehen die Zellen sogar völlige Austrocknung (Abb. 7.2d), was ihnen die Verbreitung mit dem Wind ermöglicht<sup>78</sup>. Diese Fähigkeit erlaubt es *Haematococcus pluvialis*, schnell neue Lebensräume wie Pfützen zu besiedeln, wobei ihr auch eine mäßige Salztoleranz zugute kommt<sup>79</sup>.

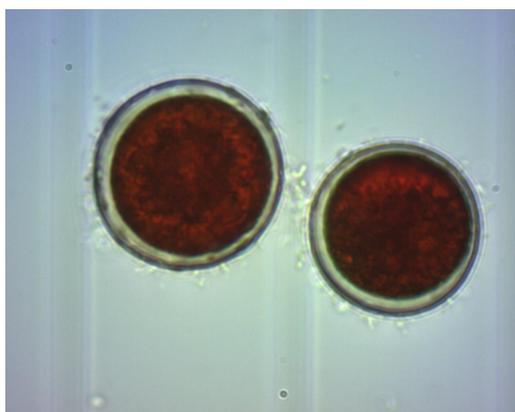
Außer der ausgeprägten Astaxanthinsynthese ist noch die große morphologische Variabilität hervorzuheben: Direkt nach der Zellteilung ist *Haematococcus pluvialis* mit Geißeln in der Lage, aktiv zu schwimmen, und verformt sich über einen noch ungestressten grünen, unbegeißelten Zwischenzustand (Abb. 7.2a) während der Astaxanthinsynthese unter Stress (Abb. 7.2b) zu roten, kugelförmigen Zellen (Abb. 7.2c)<sup>80</sup>.



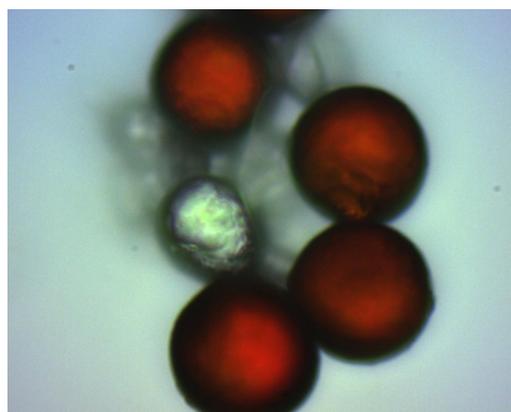
(a) Grüne, ungestresste Zellen von *Haematococcus pluvialis* ohne Geißel.



(b) *Haematococcus pluvialis* beginnt, Astaxanthin zu synthetisieren.



(c) Zum Schutz vor Stress komplett von Astaxanthin umgebene Zellen von *Haematococcus pluvialis*.



(d) Vertrocknete, durch eine Astaxanthinhülle geschützte Zellen von *Haematococcus pluvialis*.

**Abbildung 7.2:** *Haematococcus pluvialis* in unterschiedlichen Stresszuständen. Der Abstand der in den Bildern sichtbaren Linien beträgt 0,05 mm.

## 7.4 *Dunaliella salina*

*Dunaliella salina* ist eine hohe Salzkonzentrationen liebende Grünalge<sup>14</sup>, die bevorzugt in Salinen und anderen äußerst salzhaltigen Gewässern vorkommt, worin sie als einzige Algenart überleben kann. Sie synthetisiert Glycerol zum Ausgleich des osmotischen Drucks und besitzt keine feste Zellwand, weswegen sie ihr Volumen bei wechselnden Salzkonzentrationen schnell ändern kann<sup>81</sup>.

Unter Stress ist sie in der Lage, große Mengen von  $\beta$ -Carotin zu synthetisieren, was kommerziell Verwendung findet<sup>14</sup>, allerdings ist diese Art so robust, dass im Rahmen sämtlicher Versuche kein Farbumschlag beobachtet wurde.

Eine Besonderheit von *Dunaliella salina* ist, dass sie durch fallende Salzkonzentration ausgelöst Keimzellen zur geschlechtlichen Fortpflanzung bilden kann, welche anschließend Austrocknung und den Kontakt mit Süßwasser überstehen<sup>14</sup>.

## 7.5 *Porphyridium purpureum*

*Porphyridium purpureum* besitzt als Rotalge nur die beiden einander sehr ähnlichen Carotinoide  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin<sup>42</sup>. Unter Stress synthetisiert sie das Pigment Phycoerythrin, welches als Protein chemisch nicht näher mit den Carotinoiden verwandt ist<sup>13</sup>. In alter Literatur ist oft noch der frühere Name *Porphyridium cruentum* zu finden, wobei es sich um genau die gleiche Alge handelt.

Durch die besondere Pigmentausrüstung ist *Porphyridium purpureum* in der Lage, auch in grünem Licht Photosynthese zu betreiben<sup>82</sup> und dabei Wachstumsraten zu erreichen, die denen bei Beleuchtung mit rotem Licht entsprechen<sup>83</sup>.

Die Salztoleranz von *Porphyridium purpureum* ist recht ausgeprägt, so dass diese Art gleichermaßen gut in Süß- wie in Salzwasser kultiviert werden kann. Der natürliche Lebensraum ist in Süß- und Brackwasser, selten nur werden marine Vorkommen gefunden<sup>k</sup>.

## 7.6 Kulturbedingungen und Entwicklung eines Bioreaktors

Grundsätzlich handelt es sich bei Mikroalgen um kleine Pflanzen, deren Bedürfnisse sich im Allgemeinen nicht von gewöhnlichen Zimmerpflanzen unterscheiden: Außer eines

<sup>k</sup>Eintrag zu *Porphyridium purpureum* in <http://www.algaebase.org/> (Letzter Zugriff am 26. Januar 2018)

passenden Temperaturbereiches ist die Verfügbarkeit von Licht, Wasser, Kohlenstoffdioxid und mineralischen Nährstoffen entscheidend.

Definierte Nährmedien wurden nach den Anleitungen für ES-Medium<sup>84</sup> und Dun-Medium<sup>85</sup> der Göttinger Sammlung von Algenkulturen angesetzt, welche hier aus praktischen Gründen in den Abb. A.2 sowie A.3 wiedergegeben werden.

Die drei für das ES-Medium<sup>84</sup> (Abb. A.2) in größerer Menge nötigen Salze Kaliumnitrat, Dikaliumhydrogenphosphat und Magnesiumsulfat-Heptahydrat wurden mit einer Feinwaage und einem Messkolben dosiert<sup>1</sup>. Die Mikronährstofflösung besteht aus sehr vielen Salzen in sehr kleinen Konzentrationen. Ein Ansetzen mit Waage und Messkolben ist möglich, allerdings wurde für diese Arbeit eine Flasche mit der fertigen Mikronährstofflösung freundlicherweise von meinem Kollegen Serge Zagermann zur Verfügung gestellt. Da die Mikronährstoffe selbst keine vollständige Nährstoffgrundlage darstellen, ist diese Lösung problemlos im Kühlschrank über Jahre lagerfähig. Der für die Kultur empfindlicher Arten in der Anleitung enthaltene Erdauszug wurde durch destilliertes Wasser ersetzt, um das Auftreten zusätzlicher Ramanlinien von nicht näher spezifizierten Substanzen im Erdboden zu vermeiden.

Die Vorbereitung von Dun-Medium<sup>85</sup> (Abb. A.3) zur Anzucht der Salzwasseralge *Dunaliella salina* sieht die Verwendung von künstlichem Meerwasser vor, welches aus den Salzen Natriumchlorid, Magnesiumsulfat-Heptahydrat, Kaliumchlorid und Calciumsulfat angesetzt wurde. Da in dem Rezept für Dun-Medium<sup>85</sup> außer dem Erdauszug keine Quelle für die essentiellen Mikronährstoffe vorhanden ist, wurden die angegebenen 30 ml Erdauszug durch 5 ml der ES-Mikronährstofflösung sowie 25 ml destilliertes Wasser ersetzt.

Um Keimfreiheit sicherzustellen, wurden die mit Nährmedium gefüllten Glasflaschen (1 l, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit hitzebeständigem Schraubverschluss in einem großen Schnellkochtopf aus dem Restaurantbedarf für zwei Stunden gekocht. Die Deckel der Flaschen dürfen nur halb aufgeschraubt werden, um Siedeverzug oder Platzen der Flaschen zu vermeiden. Der Boden des Schnellkochtopfes wurde mit destilliertem Wasser bedeckt, um eine Dampfatmosphäre im Topf zu garantieren und ein Trockenlaufen des Bodens auf jeden Fall zu vermeiden. Zur Kontrolle muss während der Kochzeit kontinuierlich eine geringe Menge Dampf aus dem Ventil des Topfes entweichen. Beim Erreichen der zweistündigen Kochzeit wurde der Topf unter fließendem Wasser bis zum Druckabfall gekühlt und geöffnet, woraufhin die Deckel der noch heißen Flaschen unverzüglich fest verschraubt wurden.

Zum Ansetzen der aus Göttingen auf festem Gelmedium (vgl. Abb. 7.1) erhaltenen Startkulturen wurden diese jeweils mit etwas Medium in 250 ml Erlenmeyerkolben überführt.

<sup>1</sup>Vielen Dank an Ngoc Sang Ngo, der das Ansetzen der Medien oft übernommen hat.

Die Öffnungen der zuvor im Schnellkochtopf keimfrei gemachten Kolben wurden mit Aluminiumfolie abgedeckt, um das Eindringen von Staub zu vermeiden. Diffuses Tageslicht in der Nähe eines Fensters, jedoch ohne direkte Sonneneinstrahlung, war für das Anwachsen der Startkulturen ausreichend. Da sich die Algen schnell am Boden der Kolben absetzen, war ein gelegentliches Umschütteln nötig. Zur Vermehrung wurden die Kulturen jeweils auf zwei Kolben aufgeteilt und mit frischem Medium aufgefüllt.

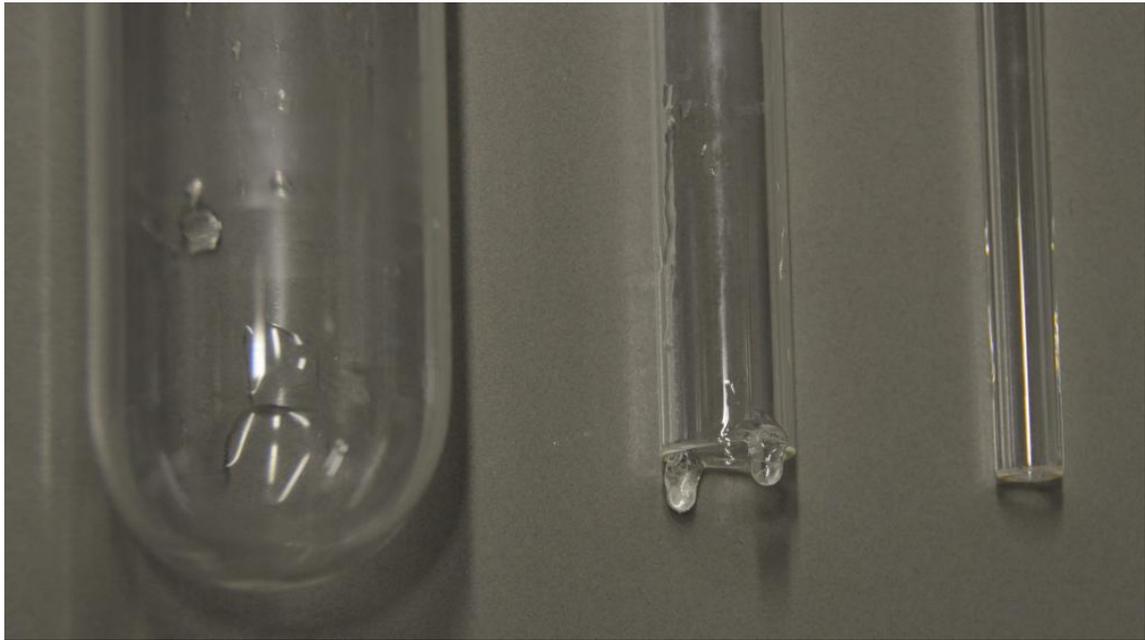
Für die Massenvermehrung wurde im Rahmen dieser Arbeit gemeinsam mit Serge Zagermann ein gläsernes Anzuchtgefäß entwickelt und angefertigt, welches aus einem großen Reagenzglas, einem Stopfen mit einer Auslassröhre und einer Luftlanze sowie einem Mammutpumpeneinsatz besteht (Abb. 7.3 und 7.4). Von der Funktionsweise her entspricht dieses Anzuchtgefäß dem in<sup>86</sup> beschriebenen "Internal-loop concentric tube reactor".



**Abbildung 7.3:** Bestandteile eines Anzuchtgefäßes: Gummistopfen mit einer kurzen (9 cm Länge, 4 mm Innendurchmesser, 8 mm Außendurchmesser), gegen Staub mit Aluminiumfolie abgedeckten Austrittsröhre und einer langen Luftlanze (47 cm Länge, 4 mm Innendurchmesser, 8 mm Außendurchmesser). Mammutpumpeneinsatz (30,5 cm Länge des Rohres, 31 cm Gesamtlänge mit aufgeschmolzenen Abstandshalternasen, 13 mm Innendurchmesser, 15 mm Außendurchmesser) zur Leitung der Luftblasen mit aufgeschmolzenen Abstandhalter-Glasnasen, um das Einströmen der Flüssigkeit am unteren Ende zu ermöglichen. Riesenreagenzglas mit abgerundetem Boden als Kulturgefäß (41 cm Länge, 36 mm Innendurchmesser, 40 mm Außendurchmesser).

Das Prinzip funktioniert so, dass die von der Luftlanze eingeblasene Luft innerhalb des Mammutpumpeneinsatzes aufsteigt (Abb. 7.5) und somit die Dichte der Luft-Flüssigkeitssäule innerhalb gegenüber der reinen Flüssigkeitssäule außerhalb verringert. Oben aus dem Mammutpumpeneinsatz, der über den oberen Rand der Kultur ragen muss, läuft die angehobene Luft-Flüssigkeitssäule über (Abb. 7.6), während unten weitere Flüssigkeit angesogen wird und so ein Kreislauf entsteht. Gleichzeitig wird eine gute Durchmischung von Luft und Kultur gewährleistet und damit die Verfügbarkeit von Kohlenstoffdioxid verbessert.

Um ein Verdunsten der Kultur bei Belüftung mit trockener Pressluft zu vermeiden, wurde eine mit destilliertem Wasser gefüllte Gaswaschflasche zur Befeuchtung der Luft verwendet. Die Belüftung wurde mit einem Druckregler sowie mit Quetschklemmen justiert. Um den Eintrag von Keimen zu minimieren, wurde die befeuchtete Luft anschließend durch

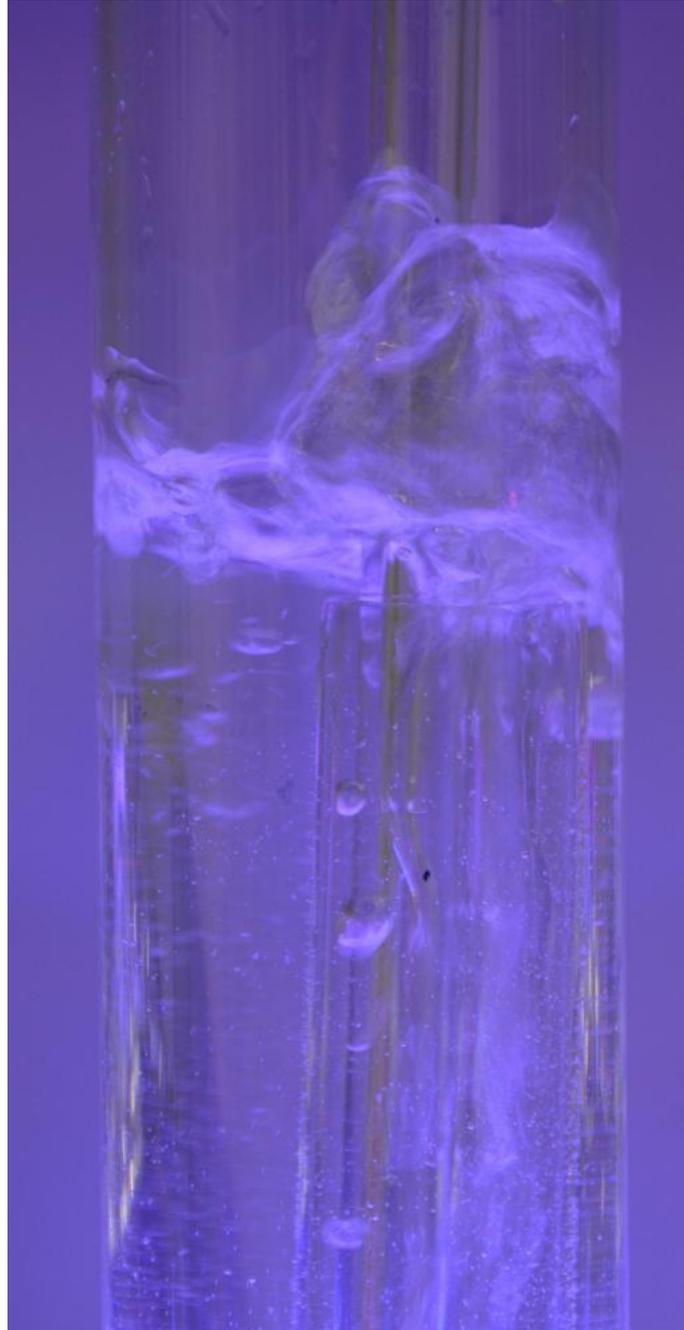


**Abbildung 7.4:** Das untere Ende der drei Bestandteile eines Anzuchtgefäßes im Detail. Der Mammutpumpeneinsatz hat unten zwei aufgeschmolzene Glasnasen als Abstandhalter zum Boden des Riesenreagenzglases.

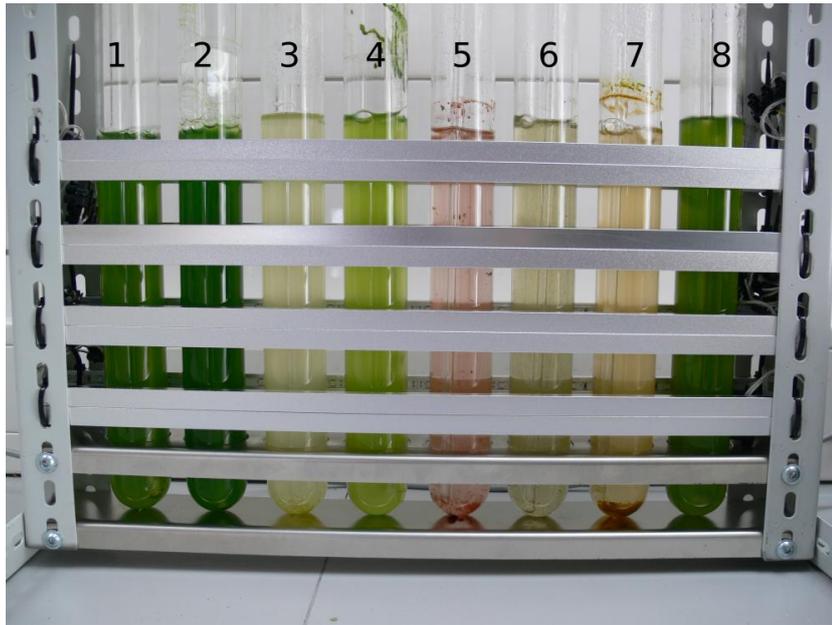
ein Sterilfilter mit 200 nm Porengröße (Midisart 2000, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland) geleitet. Die Teile des Anzuchtgefäßes, die nicht in den Schnellkochtopf passten, wurden nach Reinigung im Ultraschallbad durch gründliches Ausspülen mit Ethanol und destilliertem Wasser desinfiziert. Für die gleichmäßige Beleuchtung von acht derartigen Anzuchtgefäßen wurden rote und blaue Leuchtdiodenbänder (628 nm und 467 nm, Josef Barthelme GmbH & Co. KG, Nürnberg, Deutschland) verwendet (Abb. 7.7 und 7.8), deren Helligkeit mit einem Labornetzgerät eingestellt wurde. Alle hier verwendeten Algenarten wachsen unter Dauerlicht.



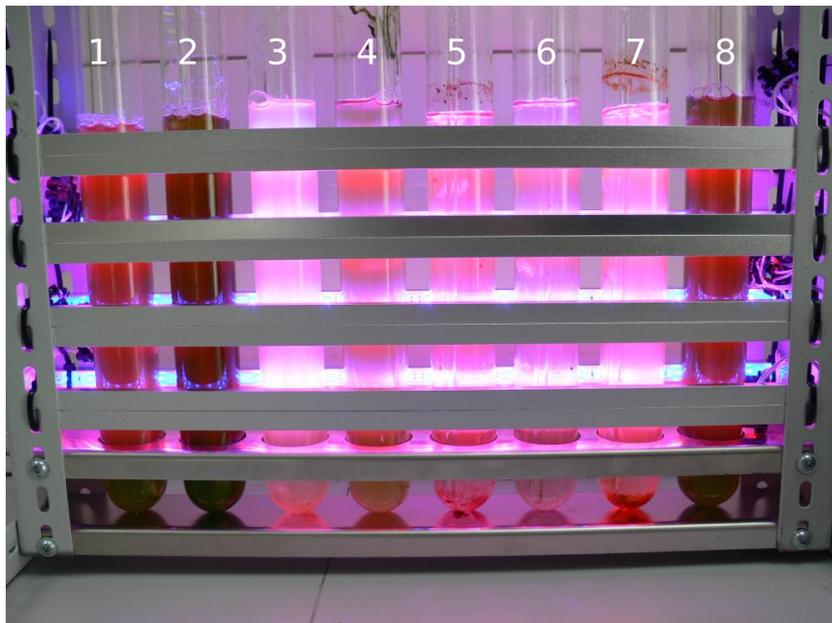
**Abbildung 7.5:** Im Betrieb steigen aus der Luftlanze Luftblasen auf, die im Mammutpumpeneinsatz nach oben geführt werden und dabei Flüssigkeit mit aufsteigen lassen. Drei Luftblasen sind hier in dem Mammutpumpeneinsatz zu erkennen. Für dieses Bild wurde das Anzuchtgefäß mit Wasser gefüllt.



**Abbildung 7.6:** Am oberen Ende wird die im Mammutpumpeneinsatz mit aufsteigende Flüssigkeit ausgeworfen und fließt wieder nach unten. Die violett erscheinende Beleuchtung kommt von den für die Anzucht verwendeten roten und blauen Leuchtdiodenbändern.



**Abbildung 7.7:** Je nach Art reagieren Algen unterschiedlich auf Stress - einige davon mit bunten Farben. Je zwei nebeneinanderliegende Röhren enthalten die gleiche Art, wobei die Algen in der linken Röhre in destilliertes Wasser umgesetzt worden ist und die rechte Röhre zum Vergleich eine ungestresste Kultur enthält. Von links nach rechts: 1 & 2 *Chlorella vulgaris*, 3 & 4 *Chlamydomonas reinhardtii*, 5 & 6 *Haematococcus pluvialis*, 7 & 8 *Porphyridium purpureum*. Nach ersten Kulturversuchen wurde *Chlamydomonas reinhardtii* durch *Dunaliella salina* ersetzt.



**Abbildung 7.8:** Bei intensiver Beleuchtung mit hellroten und blauen Leuchtdioden zeigen die Algenkulturen (vgl. Abb. 7.7) eine teilweise deutlich sichtbare dunkelrote Chlorophyllfluoreszenz.

# Kapitel 8

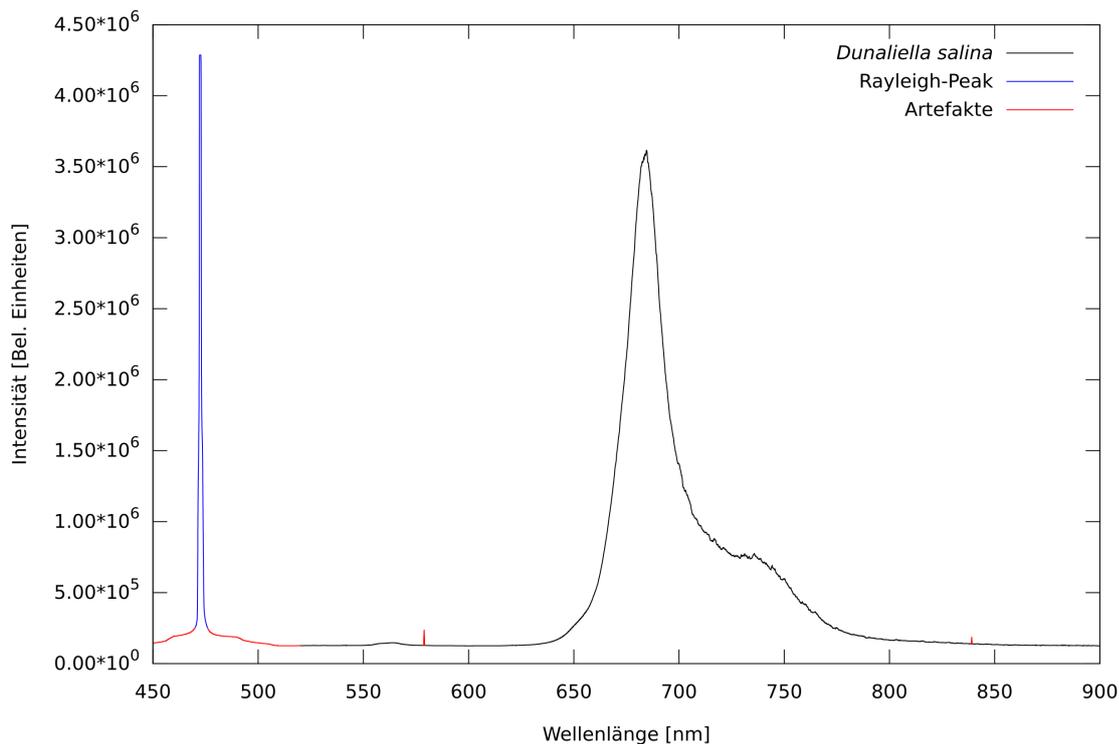
## Grundlagen der Laserspektroskopie an Algen

In diesem Kapitel soll ein Überblick gegeben werden, welche Linien beim Bestrahlen einer Algenkultur mit einem blauen Laser zu erwarten sind. Ebenso wird gezeigt, welche Schritte zur Bearbeitung nötig sind, um aus den Rohdaten ein für die weitere Auswertung geeignetes Ramanspektrum zu erhalten.

Die hier zur Veranschaulichung genutzte Messung wurde mit einer Anregungswellenlänge von 473 nm an einer Kultur von *Dunaliella salina* aufgenommen, kann aber auf Grund der großen Ähnlichkeit solcher Messungen als typisches Beispiel gelten. Eine Besonderheit sei aber vorab genannt: In der Regel wird das Spektrometer keinen so großen spektralen Bereich auf einmal abdecken können - für diesen Datensatz wurden Daten mit vielen verschiedenen Gitterpositionen aufgenommen und zusammengefügt, um "einmal alles" zeigen zu können. Eine solche "gestückelte" Messung des Spektrums dauert lange und ist in ihrer erreichbaren Genauigkeit in den Wellenlängen durch die Mechanik im Spektrometer begrenzt.

Abbildung 8.1 zeigt ein Spektrum, welches - als Einziges in dieser Arbeit - ohne optischen Rayleigh-Kantenfilter aufgenommen worden ist. Der stärkste Peak in diesem Spektrum ist die Rayleigh-Streuung des Lasers bei 473 nm, welcher jedoch den Kamerachip übersteuert und in Wirklichkeit noch intensiver ist, als es in diesen Rohdaten gesehen werden kann. Eine Einstellung der Belichtungsparameter passend zur Aufnahme des Rayleighpeaks ohne Übersteuerung ist zwar technisch möglich, aber hier aus Gründen der Vergleichbarkeit nicht sinnvoll.

Auf Grund der sehr hohen Intensität des Rayleighpeaks entstehen im Spektrometer Artefakte: Der verwendete Single-Mode-Laser hat eine spezifizierte Linienbreite von nur 12

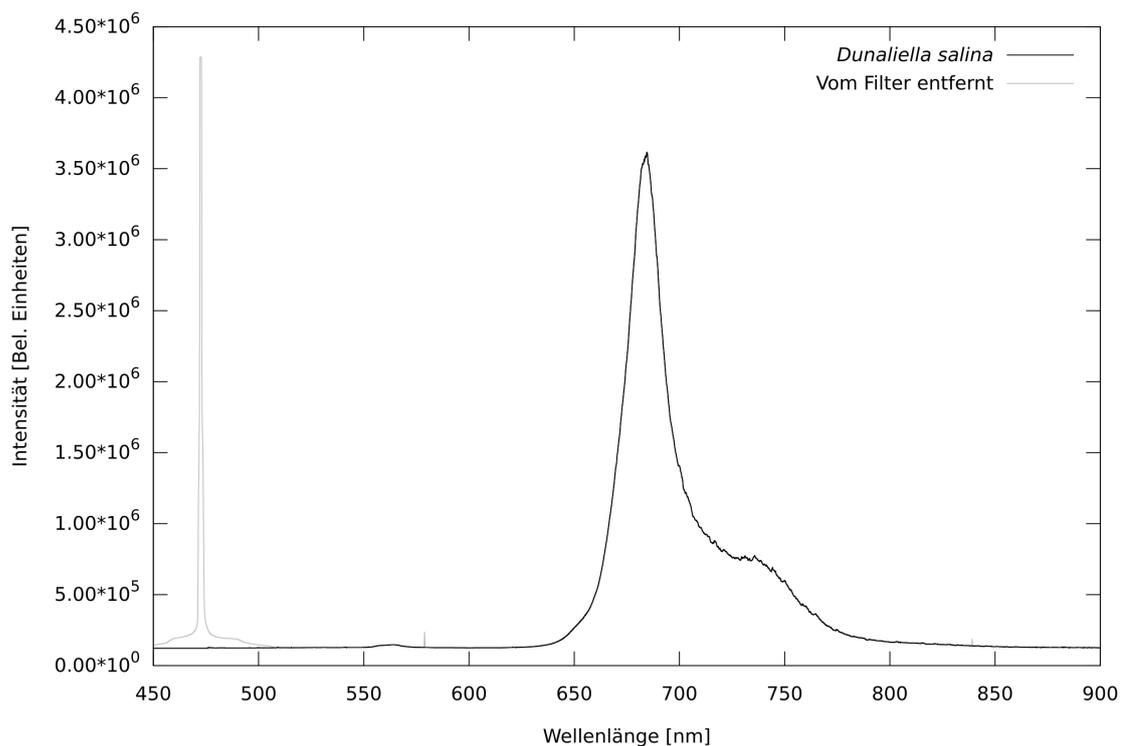


**Abbildung 8.1:** Mit einer Laserwellenlänge von 473 nm angeregtes Spektrum einer Kultur von *Dunaliella salina*, aufgenommen ohne Kantenfilter.

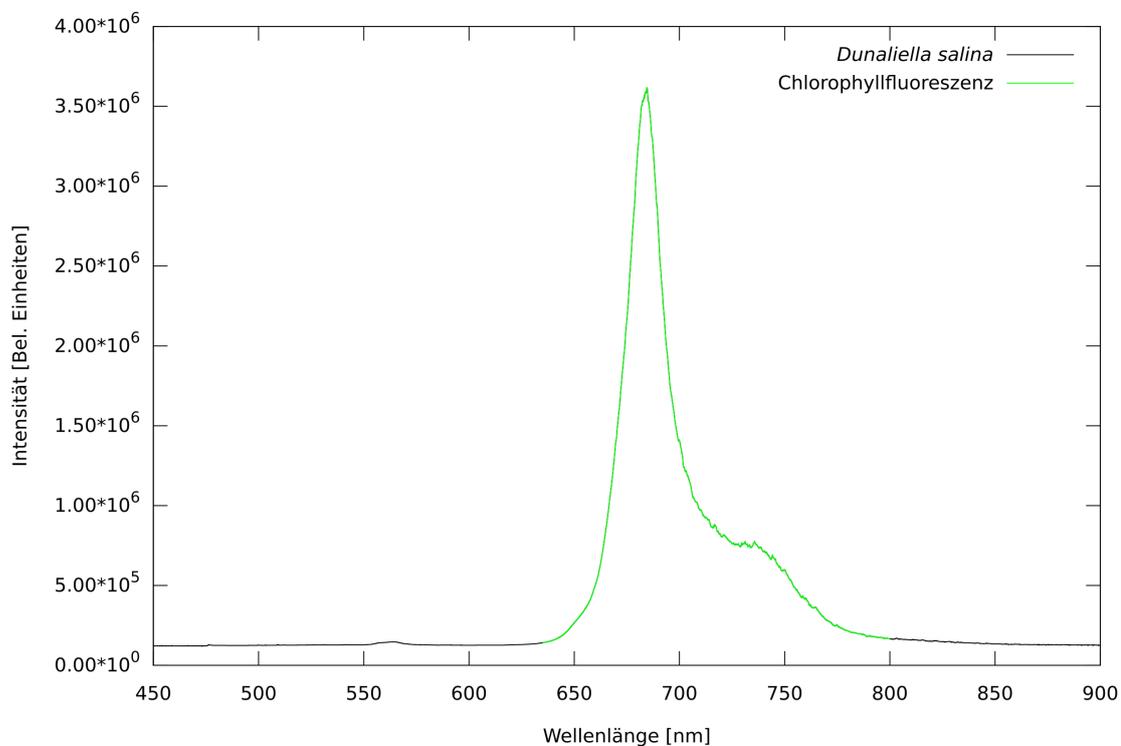
pm, außerdem zeigen Neonspektrallinien mit der verwendeten Konfiguration des Spektrometers eine Linienbreite von 68 pm. Dennoch hat der gemessene Rayleighpeak eine scheinbare Linienbreite von 1,13 nm und einen “Fuß”, der hier etwa 60 nm breit ist. Dies sind Überstreuungen im Spektrometer, die dadurch entstehen, dass einfallendes Licht an den inneren Komponenten nicht ganz perfekt, sondern zu einem sehr kleinen Teil auch diffus gestreut wird. Außerdem sind bei 579 nm und 839 nm zusätzliche Peaks zu erkennen, die Reflektionen an Bauteilen im Inneren des Spektrometers zuzuschreiben sind.

Mit einem zur Laserwellenlänge passenden optischen Tiefpass-Kantenfilter kann die intensive Rayleighstreuung um mehrere Größenordnungen abgeschwächt werden (Abb. 8.2), wodurch die in Abbildung 8.1 gezeigten Artefakte verschwinden, sofern es sich nicht um eine ungewöhnlich stark streuende Probe handelt. Alle übrigen Messungen in dieser Arbeit wurden unter Verwendung von Kantenfiltern aufgenommen.

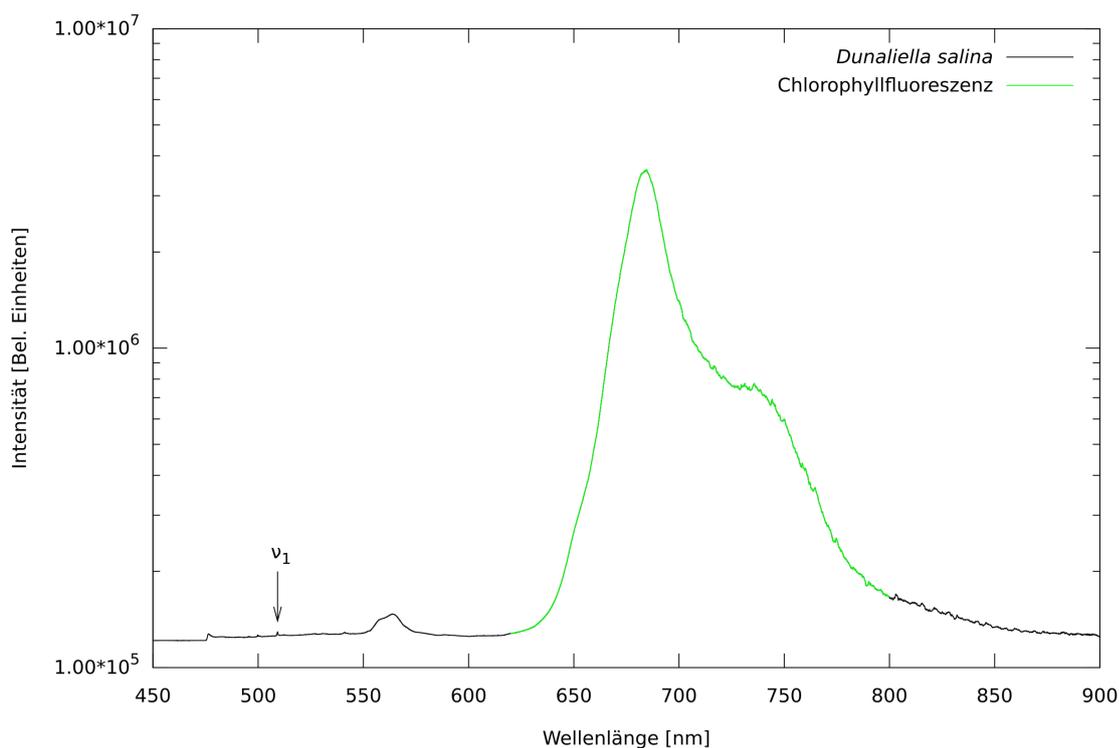
Der zweitstärkste Peak beim Bestrahlen einer Algenprobe mit einem blauen Laser ist die Chlorophyllfluoreszenz (Abb. 1.1 und 7.8, vgl. Kap. 2). Sie sorgt in einem blauen Laserstrahl für ein - je nach Schutzbrille - mit dem Auge gut sichtbares dunkelrotes Aufleuchten der Probe und ist nur bei lebendigen Algen zu beobachten. Ist der zur Anregung verwendete Laserstrahl zu intensiv oder zu stark gebündelt, so ist innerhalb von wenigen Sekunden ein Abklingen und Verschwinden der dunkelroten Chlorophyllfluoreszenz zu beobachten. Dies ist ein guter Indikator für die Zerstörung der Probe. Manchmal wird die



**Abbildung 8.2:** Mit dem Einsatz eines Kantenfilters verschwinden der Rayleighpeak und die in Abb. 8.1 markierten Artefakte im Spektrum von *Dunaliella salina*.



**Abbildung 8.3:** Die hier hervorgehobene Chlorophyllfluoreszenz ist nach der Rayleighstreuung der intensivste Peak im Spektrum einer mit einem blauen Laser angeregten Algenkultur.

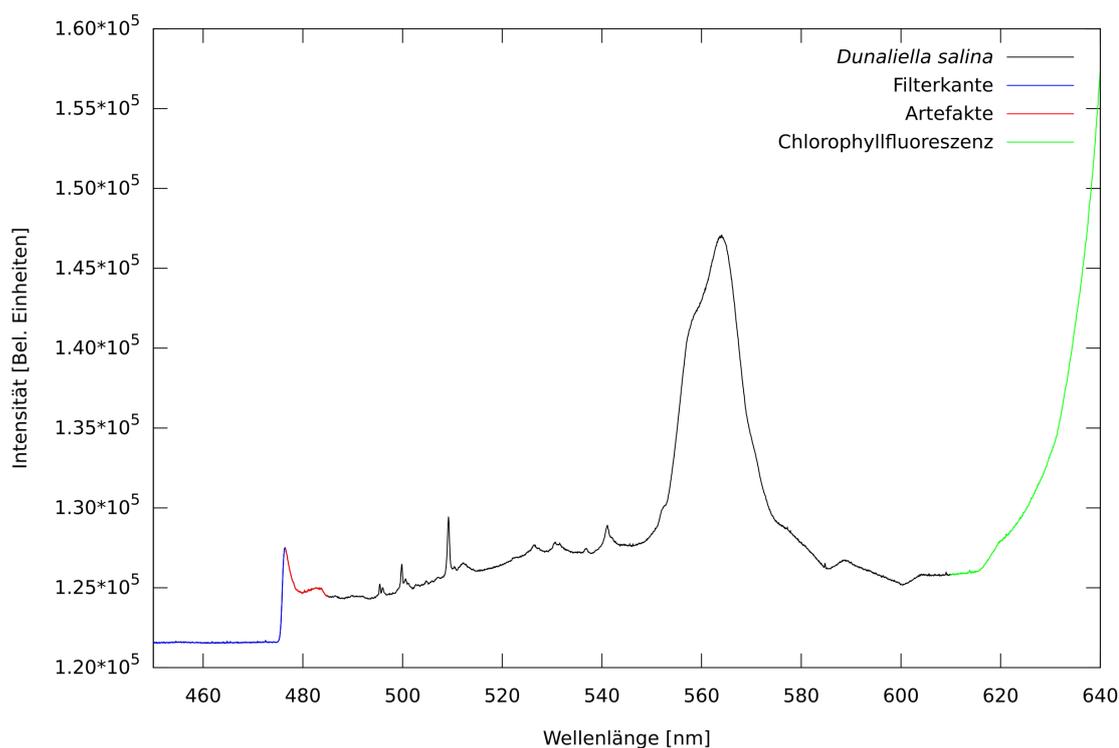


**Abbildung 8.4:** Zur Veranschaulichung der Intensitätsverhältnisse noch einmal der gleiche Ausschnitt wie in Abb. 8.3, jedoch mit einer logarithmischen Intensitätsskala. Die Ramanlinien sind hier schwach zwischen 480 nm und 610 nm zu erkennen, wobei die stärkste Carotinoid-Ramanlinie mit einem Pfeil markiert ist.

dunkelrote Fluoreszenz dabei auch von einer wesentlich schwächeren, durch die Schutzbrillen gelblich erscheinenden Fluoreszenz abgelöst, die auch an alten Kulturen mit vielen toten Zellen beobachtet werden kann. Zur Verteilung der Intensität des Anregungsstrahls auf möglichst viele Algenzellen wurde die Kultur bei Langzeitmessungen mit einem magnetischen Rührfisch kontinuierlich umgewälzt, so dass individuelle Zellen nur kurz in den Strahl gelangt sind.

Um ein Maß für die Intensitätsverhältnisse zu geben, ist in Abb. 8.4 noch einmal der gleiche Ausschnitt wie in Abb. 8.3 in logarithmischer Skalierung der Intensitätsachse gezeigt. Alle Ramanlinien sind in dem hier relativ flach erscheinenden Bereich bis hin zu 610 nm enthalten, der im Folgenden noch näher betrachtet werden soll. Im Vergleich zur stärksten Carotinoid-Ramanlinie (vgl. Abb. 8.13) ist die Chlorophyllfluoreszenz hier etwa 315 mal so intensiv, was ein entsprechendes Signal-zu-Rausch-Verhältnis sowie eine gute Empfindlichkeit der Messung erfordert, sollen Ramanlinien beobachtet werden.

Abbildung 8.5 ist ein Ausschnitt aus der bislang gezeigten Messung, wobei ein kleiner Teil der Flanke der Chlorophyllfluoreszenz (vgl. Abb. 8.3) noch eingezeichnet ist. Insbesondere die Wirkung des ab Abb. 8.2 verwendeten Kantenfilters ist hier gut zu erkennen: Unterhalb von 476 nm ist fast kein Signal mehr zu sehen, erst bei weiterer Vergrößerung wäre noch ein kleiner Überrest des Rayleighpeaks zu beobachten. Ebenso ist der ohne



**Abbildung 8.5:** Vergrößerung des Bereiches zwischen Laserwellenlänge und Chlorophyllfluoreszenz aus dem Spektrum von *Dunaliella salina*.

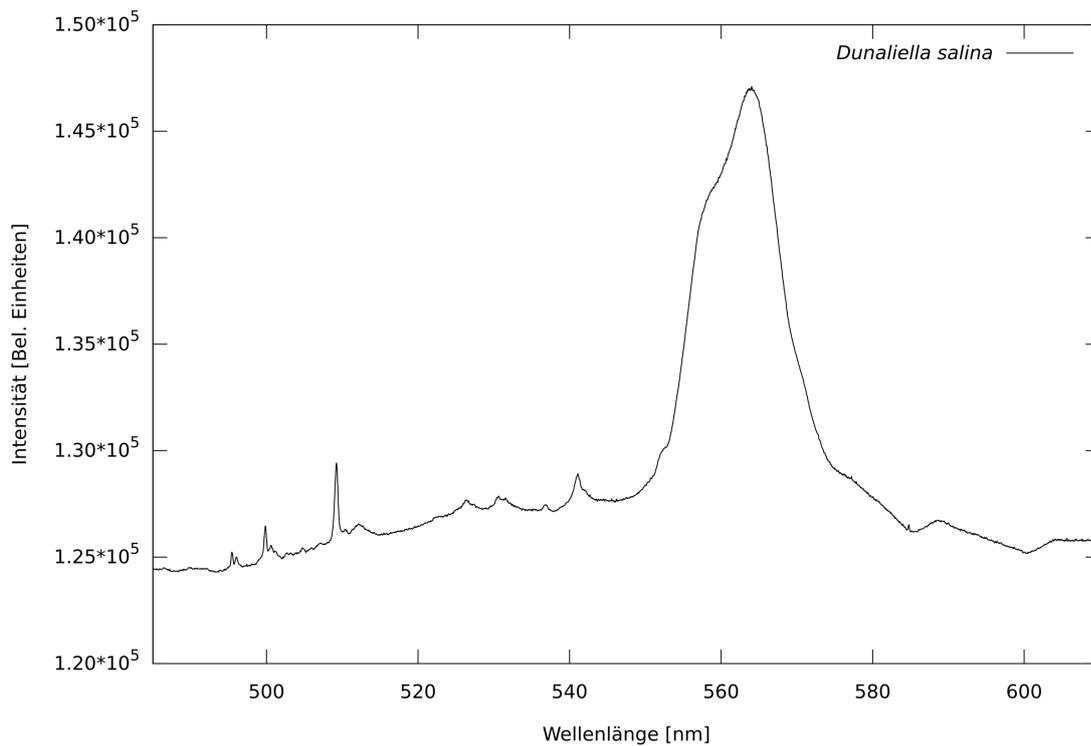
Filter äußerst breite “Fuß” stark reduziert, allerdings handelt es sich in dem Bereich von der Filterkante bis 485 nm immer noch um Artefakte. Dies wurde dadurch überprüft, dass eine stark streuende Probe mit einem aus der Literatur bekannten Ramanspektrum, Bariumsulfat, vermessen wurde.

Nach dem Abschneiden der Filterkante, der benachbarten Artefakte sowie der Flanke der Chlorophyllfluoreszenz bleibt in Abb. 8.6 der Bereich der Ramanlinien übrig.

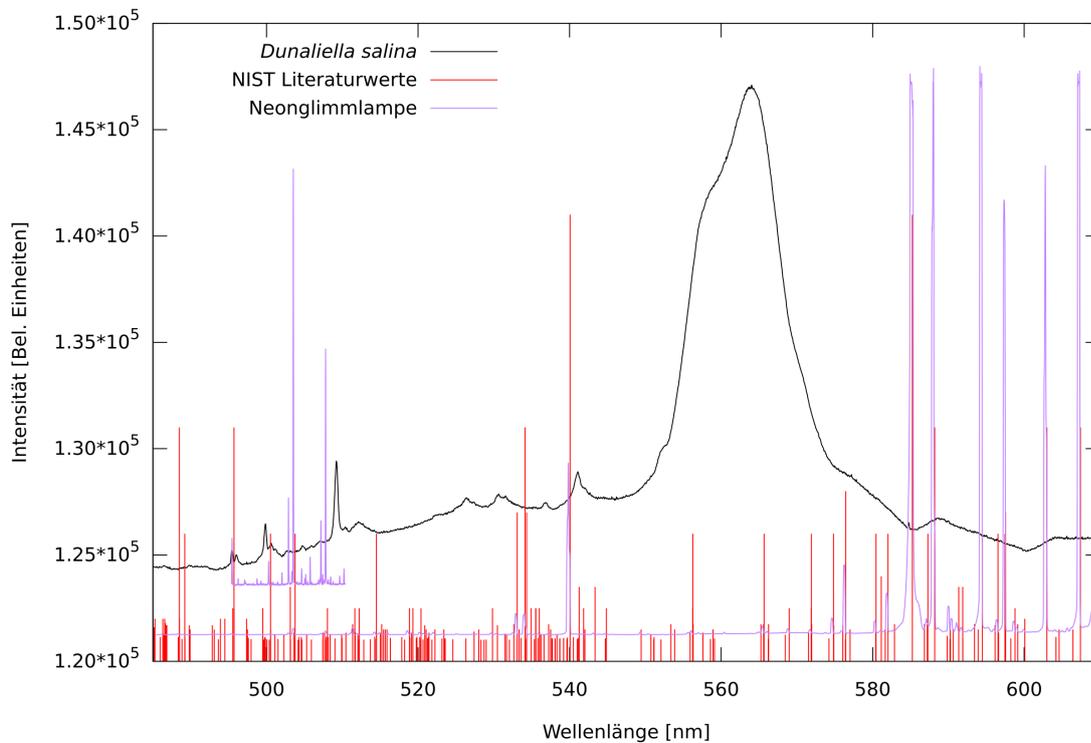
Während die Chlorophyllfluoreszenz aufgrund ihrer großen natürlichen spektralen Breite keine hohen Anforderungen an die Genauigkeit der Wellenlängenmessung stellt, ist für Ramanspektroskopie eine exakte Kenntnis der Wellenlänge essentiell. Um eine gute Kalibration zu erreichen, wurde das orange aussehende Leuchten einer Neonglimmlampe vermessen. In Abbildung 8.7 wurden die Messdaten mit dem gemessenen Neonspektrum überlagert, dessen Intensität jedoch zum Zwecke der Veranschaulichung passend zu den Messdaten skaliert wurde. Der etwas höher eingezeichnete Teil stellt eine Vergrößerung eines typischerweise für eine Ramanmessung an Algen verwendeten Ausschnitts dar. Am unteren Bildrand sind zum Vergleich die aus der “NIST Atomic Spectra Database”<sup>m</sup> entnommenen präzisen Linienlagen von Neon eingezeichnet.

Wesentlich ist, dass in der Atomspektrendatenbank eine vollständige Ionisation des Edel-

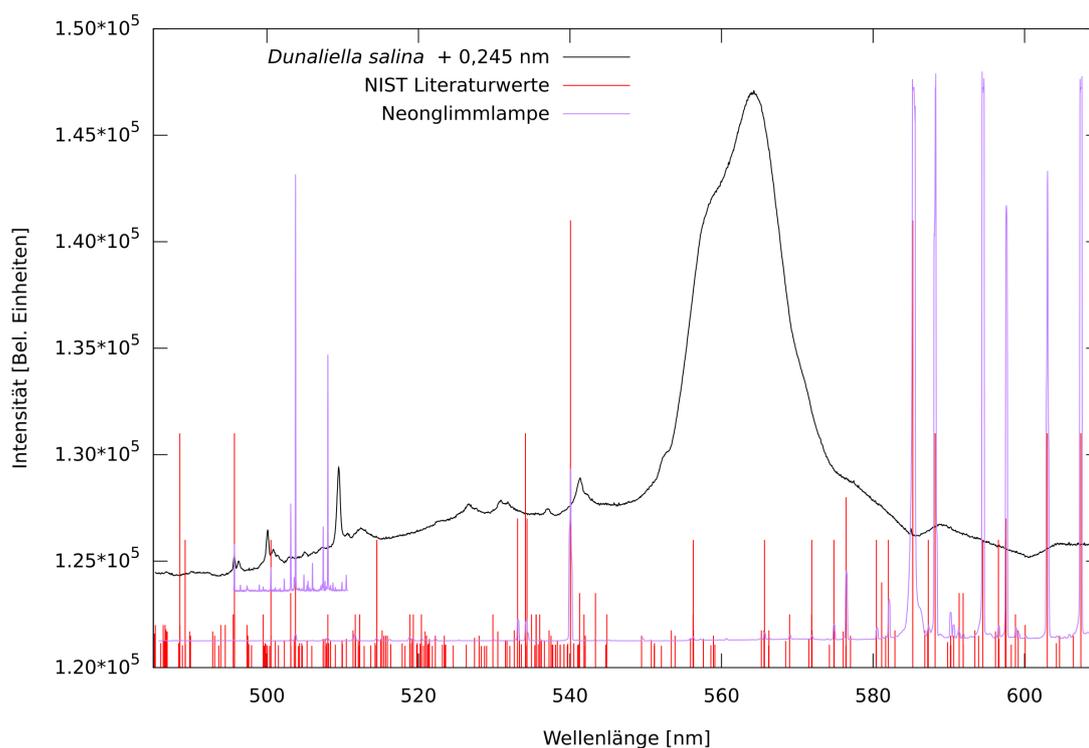
<sup>m</sup><https://www.nist.gov/pml/atomic-spectra-database> (Letzter Zugriff am 15. März 2018)



**Abbildung 8.6:** Der Bereich der Ramanlinien von *Dunaliella salina*. Artefakte und Chlorophyllfluoreszenz sind in diesem Ausschnitt nicht mehr enthalten. Der intensive Peak bei 560 nm ist die sehr breite Ramanlinie von Wasser<sup>87</sup>.



**Abbildung 8.7:** Zur Kalibration der Wellenlängen verwendetes Spektrum einer Neonglimmlampe. Im Vergleich mit den aus der Literatur bekannten Linienlagen von Neon ist noch ein Offset zu erkennen.

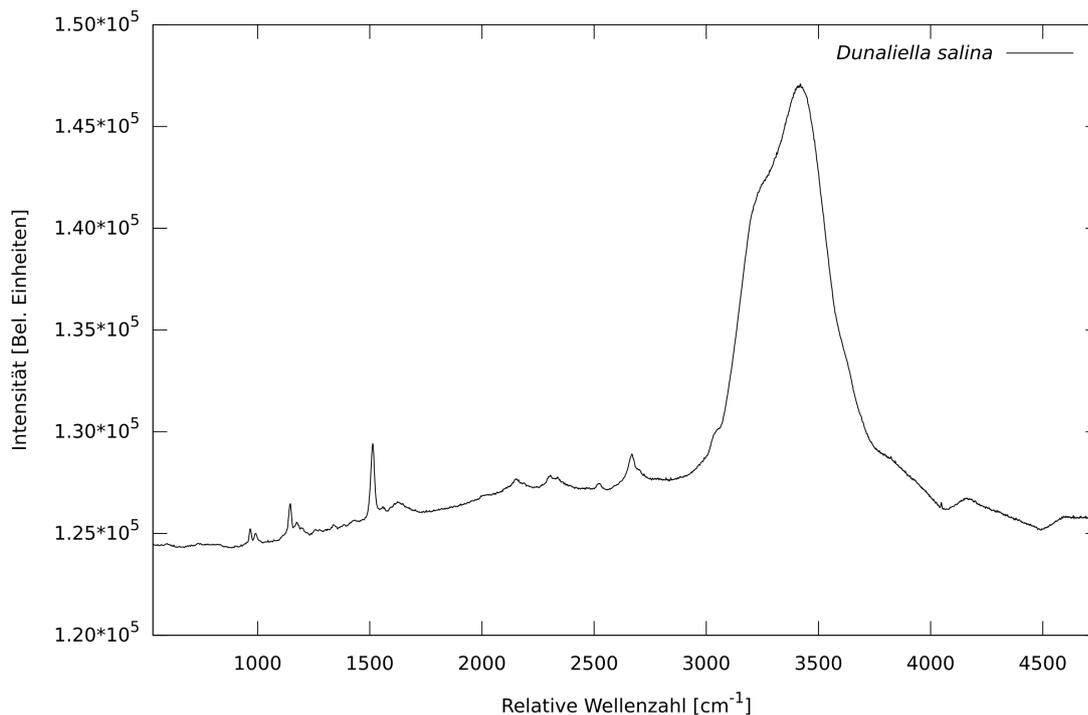


**Abbildung 8.8:** Mit Hilfe der Neonspektrallinien korrigierte Wellenlängenskala des Ramanspektrums von *Dunaliella salina*. Im Vergleich zu Abb. 8.7 stimmen die gemessenen Neonspektrallinien nun von ihrer Lage her mit den Literaturwerten von Neon überein.

gases angenommen wird, während die in handelsüblichen und in vielen Steckdosenleisten mit Leuchtschaltern eingebauten Glimmlampen brennende Gasentladung bei weitem nicht so hohe Temperaturen erreicht. Das bedeutet, dass die Intensitäten der gemessenen Spektrallinien zum Kurzwelligen hin gegenüber den Literaturwerten abfallen. Ebenso lassen sich nicht alle aus der Literatur bekannten Linien beobachten, da einige davon höhere Ionisationsstufen erfordern.

Im Gegensatz zu einer üblicherweise für die Kalibration von Spektrometern verwendeten Quecksilberdampfampe ist es besonders praktisch, dass Neon auch im blauen und grünen Spektralbereich relativ viele Linien aufweist, die sich gut für die Kalibration des experimentellen Aufbaus für Resonanz-Ramanspektroskopie an Carotinoiden eignen.

In Abbildung 8.8 wurde der Offset des Spektrometers anhand der Lage der Neonspektrallinien zu 0,245 nm bestimmt und korrigiert, so dass die Linienpositionen nun mit den Literaturwerten übereinstimmen. Es ist üblich, die Offsetkorrektur eines Spektrometers vor der Messung durchzuführen und in den Daten als gegeben anzusehen; allerdings hält eine solche Kalibration nur solange an, wie die Mechanik im Spektrometer nicht bewegt wird und die Temperatur konstant bleibt. Deshalb ist es sinnvoll, auch in laufenden Experimenten immer wieder Kalibrationslinien aufzunehmen und mit den Messergebnissen gemeinsam zu archivieren, so dass eine spätere Kalibration durchgeführt werden kann und



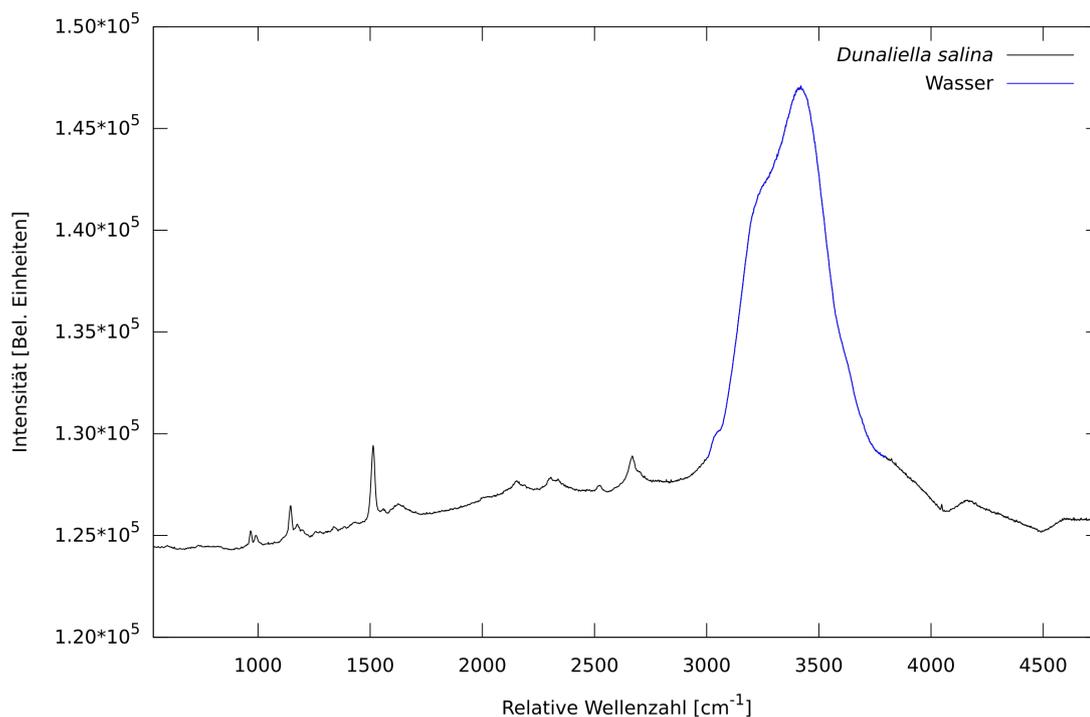
**Abbildung 8.9:** Der gleiche Ausschnitt aus dem Spektrum von *Dunaliella salina* wie in Abb. 8.6, jedoch auf der Wellenzahlskala dargestellt.

eine Gegenprobe auf später bekannt werdende mechanische Schwierigkeiten und Defekte in der Spektrometermechanik ermöglicht wird.

In der Ramanspektroskopie ist, wie bereits beschrieben, die Einheit “relative Wellenzahl” üblich (wie in Abb. 8.9 verwendet), die proportional zu der Energiedifferenz der gestreuten Photonen zu den durch den Laser eingestrahnten Photonen ist (siehe Kap. 3). Damit werden Ramanspektren vergleichbar, die mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen aufgenommen worden sind. Da die spektrale Lage der Chlorophyllfluoreszenz - und Fluoreszenz allgemein - keinen direkten Zusammenhang mit der Anregungsphotonenenergie besitzt, wäre die Verwendung der Einheit “relative Wellenzahl” dafür zwar rechnerisch möglich, aber unpraktisch.

Es existieren verschiedene Konventionen über das Vorzeichen der Energiedifferenz sowie der Art der Darstellung von Ramanspektren. Diese Arbeit folgt durchgängig der Konvention des “Journal of Raman Spectroscopy”, wonach Stokes-Linien positive relative Wellenzahlen zugeordnet werden und wobei die kleinste Wellenzahl links in einer Abbildung dargestellt wird.

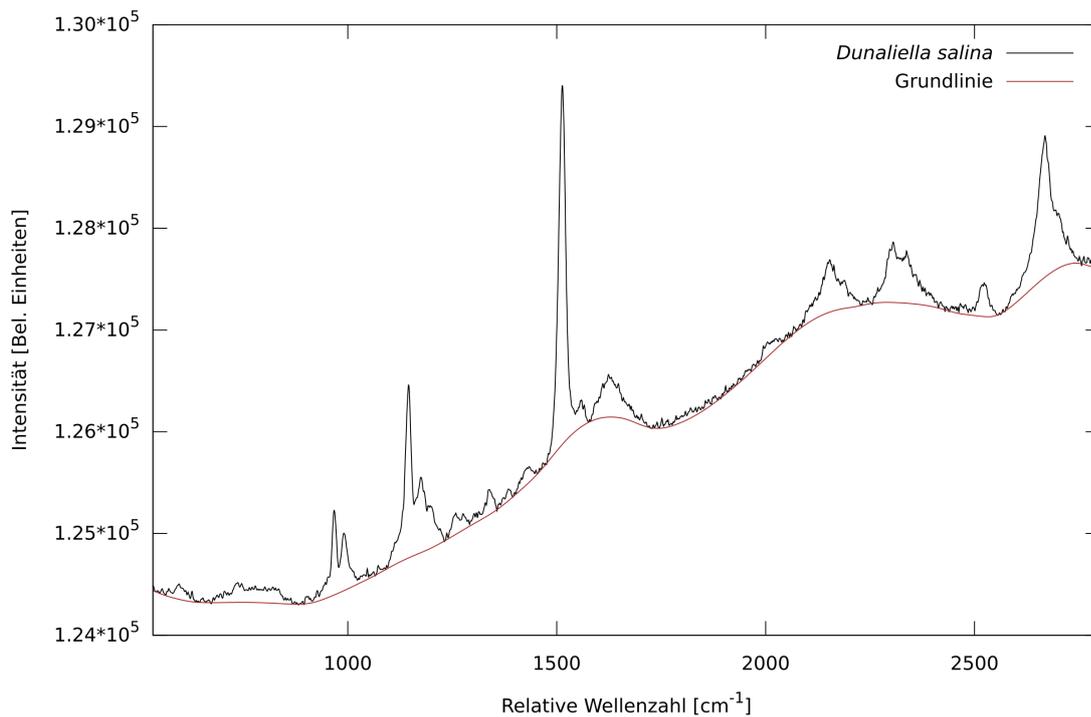
Die stärkste - und breiteste - Ramanlinie ist die von Wasser, welche von  $3000\text{cm}^{-1}$  bis  $3800\text{cm}^{-1}$  in Abb. 8.10 zu sehen ist. Diese Linie, deren genaue Form auch vom Salzgehalt in der Probe abhängt, besteht der Literatur gemäß aus intermolekularen OH-Streckschwingungen, welche zusätzlich durch die in flüssigem Wasser ausgeprägten Was-



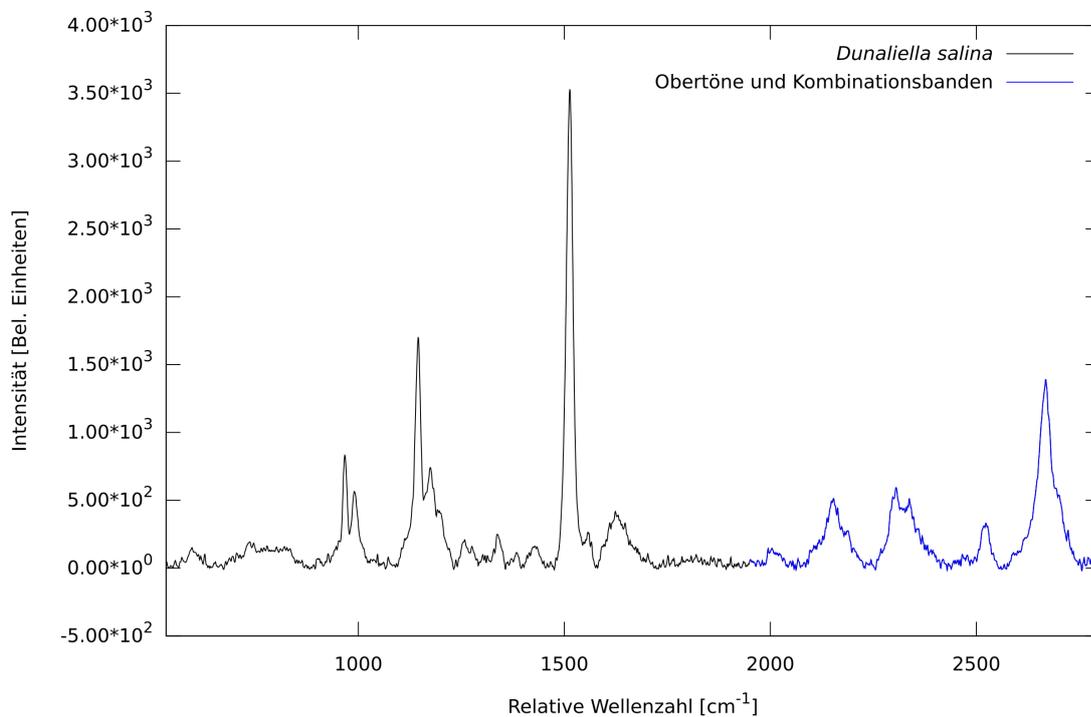
**Abbildung 8.10:** Hervorgehoben ist die Ramanlinie von Wasser im Spektrum von *Dunaliella salina*.

serstoffbrückenbindungen verbreitert werden<sup>87</sup>. Für Messungen an Algen ist die Wasser-Ramanlinie vor allem bei der Justage des Aufbaus interessant, da sie bei gewöhnlicherweise anzutreffenden Zelldichten der Algenkultur wie hier etwa sechsmal so intensiv ist wie die stärkste Carotinoidlinie unter resonanter Anregung. Kann also die Ramanlinie von Wasser nicht in den gewonnenen Daten beobachtet werden, ist eine Messung der Carotinoide ausgeschlossen.

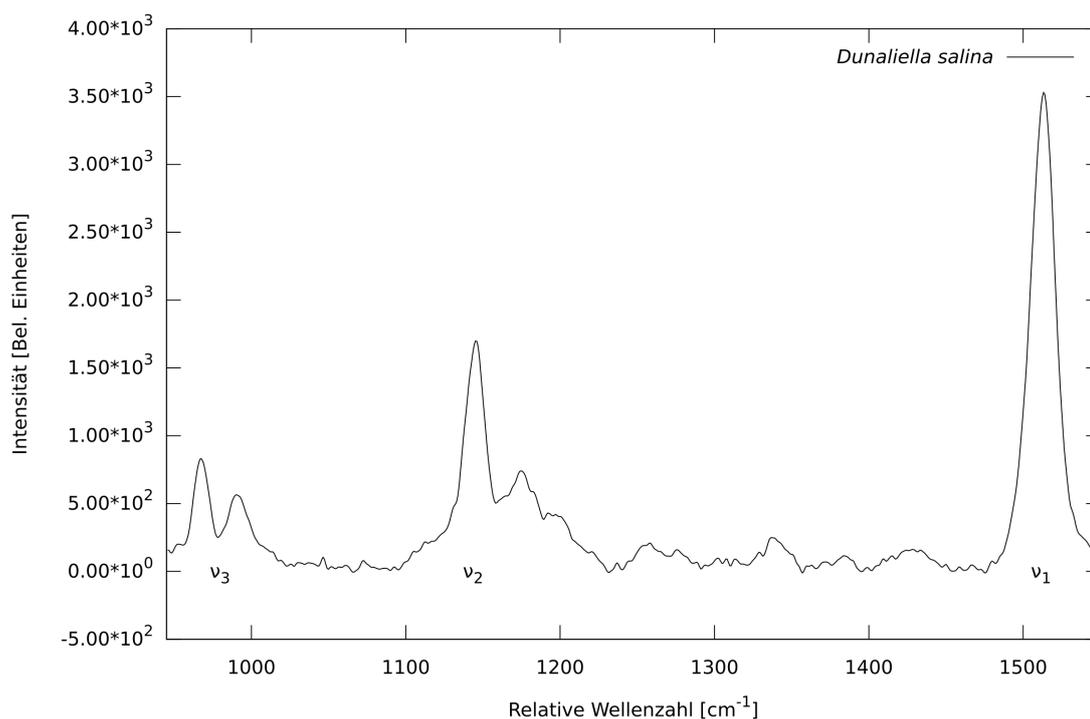
Für die quantitative Auswertung der Spektren ist jedoch zuvor noch eine Grundlinienkorrektur durchzuführen, die die breite Basis von den schmaleren Ramanlinien separiert. In Abb. 8.11 ist die mit dem morphologischen Algorithmus (Kap. 6) berechnete Grundlinie zur Veranschaulichung einmal in die Messdaten eingezeichnet. Ohne die intensive Ramanlinie von Wasser sind die übrigen Ramanlinien besser zu erkennen. Chlorophyllbanden sind zwischen  $1600 \text{ cm}^{-1}$  und  $1800 \text{ cm}^{-1}$  zu sehen, während die übrigen Ramanlinien zu Carotinoiden gehören (vgl. Abb. 11.1 und 11.2). Theoretisch sollten Carotinoide keine Fluoreszenz zeigen<sup>11</sup>, dennoch lässt sich experimentell eine schwache, grüne Fluoreszenz zwischen 505 nm and 530 nm beobachten<sup>31</sup>, welche zur Grundlinie beiträgt. Ein weiterer Anteil der Grundlinie kommt von inneren diffusen Streuungen im Spektrometer, die in der ersten Abbildung 8.1 beim ungefilterten Rayleighpeak sehr deutlich zu sehen sind. Grundsätzlich ist die exakte Form der Grundlinie variabel und kann sich im Detail mit der Zeit verändern, so dass die Grundlinie für jedes einzelne gemessene Spektrum separat bestimmt und abgezogen werden muss.



**Abbildung 8.11:** Die berechnete Grundlinie des Spektrums von *Dunaliella salina*, die anschließend von den Messdaten abgezogen wird.



**Abbildung 8.12:** Obertöne und Kombinationsbanden der Carotinoid-Ramanlinien. Da in der Algenkultur eine Mischung vieler Carotinoide enthalten ist und nur die stärksten Linien in dieser Messung sichtbar sind, lässt sich keine exakte Zuordnung der unterschiedlichen, blau markierten Kombinationen der Grundschwingungen wie beispielsweise für  $\beta$ -Carotin in<sup>88,89</sup> angeben.



**Abbildung 8.13:** Ein fertig bearbeitetes Carotinoid-Ramanspektrum von *Dunaliella salina*. Der hier gewählte Ausschnitt entspricht dem Bereich, der mit dem verwendeten Aufbau ohne Gitterbewegungen aufgenommen werden kann. Die drei stärksten Carotinoidbanden werden in dieser Arbeit mit  $\nu_1$  (bei  $1525\text{ cm}^{-1}$ ),  $\nu_2$  (bei  $1150\text{ cm}^{-1}$ ) und  $\nu_3$  (je nach Algenart bei  $980\text{ cm}^{-1}$  oder  $1005\text{ cm}^{-1}$ ) bezeichnet, welche in allen folgenden Auswertungen näher betrachtet werden.

Obertöne und Kombinationsbanden sind in Abb. 8.12 ab  $2000\text{ cm}^{-1}$  zu sehen, welche durch Kopplung und Mischung der Carotinoidlinien untereinander entstehen.

Abbildung 8.13, die letzte in dieser Reihe, zeigt schließlich einen fertig bearbeiteten, typischen Ausschnitt mit den drei stärksten Carotinoid-Ramanlinien  $\nu_1$  (bei  $1525\text{ cm}^{-1}$ ),  $\nu_2$  (bei  $1150\text{ cm}^{-1}$ ) und  $\nu_3$  (bei  $1005\text{ cm}^{-1}$ ), wie er mit nur einer einzigen Gitterposition und ohne Bewegung der Mechanik des Spektrometers aufgenommen werden kann. Die genauen Lagen der Banden und ihre Intensitätsverhältnisse unterscheiden sich für verschiedene Carotinoide bzw. deren Mischungen (vgl. Abb. 11.2 und 11.3), was insbesondere bei  $\nu_3$  deutlich zu beobachten ist. Während bei *Dunaliella salina* die Linie bei  $980\text{ cm}^{-1}$  stärker ausgeprägt ist (hier und in Abb. 11.1), überwiegt bei den anderen untersuchten Algenarten die Linie bei  $1005\text{ cm}^{-1}$  (Abb. 10.1), was auch von der verwendeten Anregungsintensität abhängen kann<sup>90</sup>. Ebenso sind die Linienlagen von der Anregungswellenlänge abhängig<sup>12</sup>.



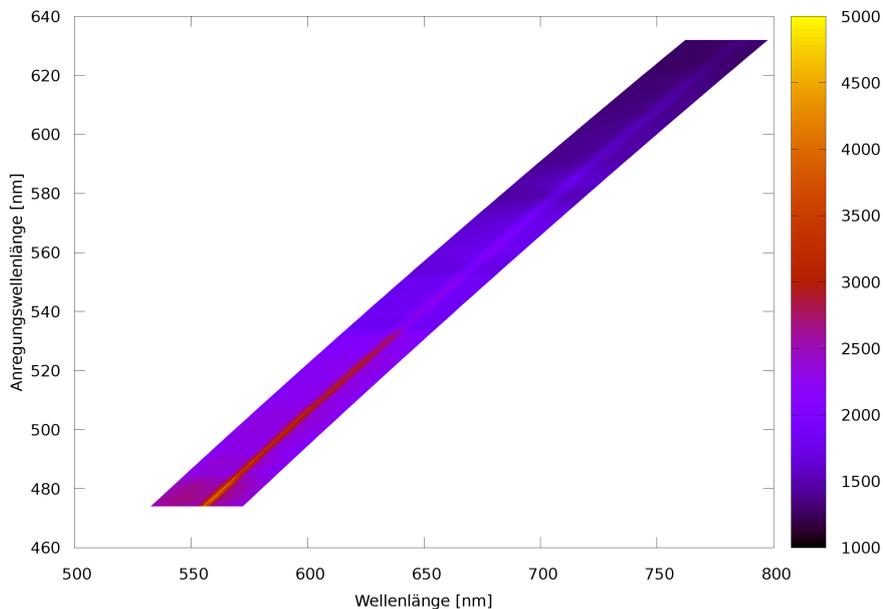
# Kapitel 9

## Eine Einführung in die Erstellung von Resonanzkarten

Resonanzkarten veranschaulichen die Abhängigkeit der Intensität der Ramanlinien von der Anregungswellenlänge und bestehen aus mehreren separat aufgenommenen Raman-spektren mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen. Ramanlinien erscheinen in Resonanzkarten als vertikale Linien, während andere optische Signale wie zum Beispiel atomare Spektrallinien als diagonale Linien erscheinen, da diese nicht der Änderung der Anregungswellenlänge folgen. Resonanzprofile schließlich sind ein Ausschnitt aus einer Resonanzkarte und geben die durch Lorentz-anpassung bestimmten Intensitäten einzelner Ramanlinien in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge wieder, wobei die einzelnen Ramanlinien einer einzigen Substanz durchaus unterschiedliche Resonanzprofile aufweisen können<sup>10</sup>.

Zur Veranschaulichung wurde Ethanol für dieses Kapitel im hohen Wellenzahlenbereich von  $2600\text{cm}^{-1}$  bis  $3100\text{cm}^{-1}$  (vgl. Abb. 9.5) vermessen, in dem keine spektralen Artefakte wie in Abb. 8.5 auftreten. Da die Pulsenergien des verwendeten optisch-parametrischen Oszillators schwanken, muss für jedes einzelne Spektrum zusätzlich die Summe der eingestrahlten Pulsenergien gemessen werden. Die unbearbeiteten Rohdaten liegen zunächst in der Wellenlängenskala vor und bilden bei der Darstellung als Resonanzkarte eine "Diagonale", da sich der Bereich der Ramanlinien mit der Anregungswellenlänge verschiebt (Abb. 9.1).

Nach der Umrechnung von Wellenlängen in relative Wellenzahlen ergibt sich bereits annähernd die spätere Form der Resonanzkarte (Abb. 9.2). Gitter und Kamera im Spektrometer erfassen einen gleichbleibend breiten Wellenlängenbereich, jedoch ist die Umrechnung von Wellenlängen in Wellenzahlen nicht linear, weswegen sich der abgedeckte Wellenzahlenbereich mit der Anregungswellenlänge ändert. Durch die Wahl eines passenden

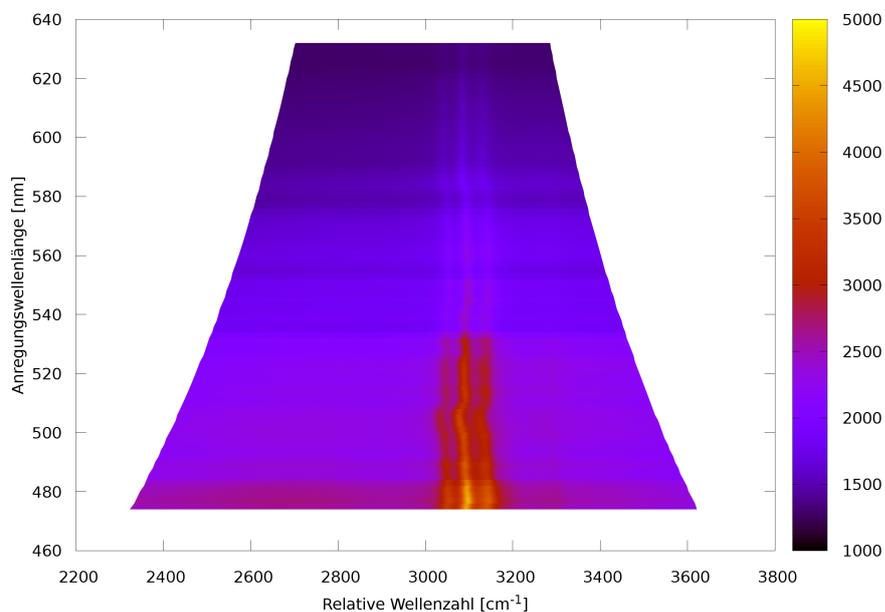


**Abbildung 9.1:** Unbearbeitete Rohdaten für eine Resonanzkarte von Ethanol.

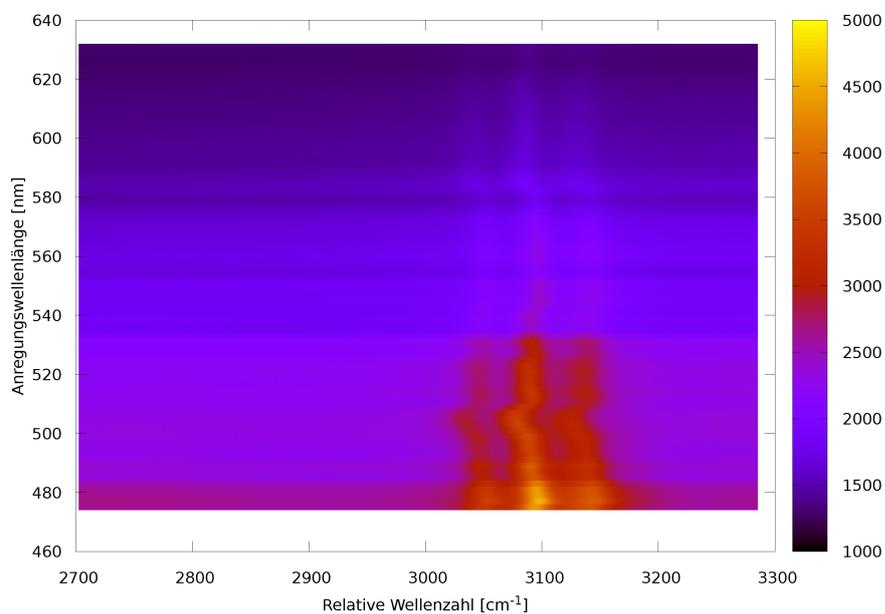
Ausschnittes wird anschließend der Wellenzahlenbereich sämtlicher in der Resonanzkarte verwendeter Ramanspektren angeglichen (Abb. 9.3).

Für die Auswertung der Daten ist eine Grundlinienkorrektur erforderlich, welche die Fluoreszenz und den Hintergrund des Spektrometers entfernt (Abb. 9.4). Im Vergleich der Abbildungen 9.3 und 9.4 ist gut zu sehen, dass vor allem der apparative Hintergrund sich recht sprunghaft mit der Anregungswellenlänge ändern kann.

Die “Schlangenlinien”, die in den Ethanolramanlinien zu sehen sind und in Abb. 9.5 korrigiert werden, rühren von dem wechselnden Offset des Spektrometers her, können aber auch in einer Ungenauigkeit der ausgegebenen Wellenlängen des durchstimmbaren Lasers begründet sein. Um die anregungswellenlängenabhängigen Offsets zu bestimmen, wurden bei Ramanspektren mit präziser Festfrequenzanregung Neonspektrallinien verwendet (Abb. 5.7 und 8.8). Für Resonanzkarten jedoch hat sich die Offsetkalibration mit Hilfe einer Referenzprobe als nützlich erwiesen, da somit auch kleine Ungenauigkeiten der Anregungswellenlänge näherungsweise ausgeglichen werden können. Insbesondere Bariumsulfat und Ethanol haben sich im Rahmen dieser Arbeit als praktische und gut handhabbare Referenzproben bewährt. Für den hohen Wellenzahlenbereich, der in diesem Kapitel zur Veranschaulichung gewählt worden ist, kam jedoch nur Ethanol in Frage, so dass hier Ethanol auf sich selbst kalibriert wird (Abb. 9.5). Die Veränderung des Wellenzahlenbereiches beim Übergang von Abb. 9.4 zu 9.5 ergibt sich durch die Verschie-

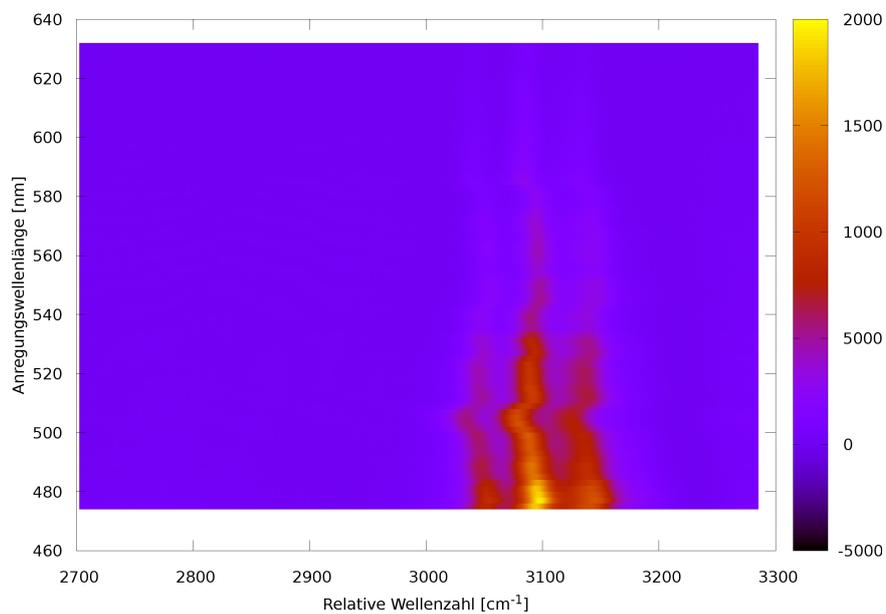


**Abbildung 9.2:** Rohdaten für eine Resonanzkarte von Ethanol, dargestellt in der Wellenzahlskala.

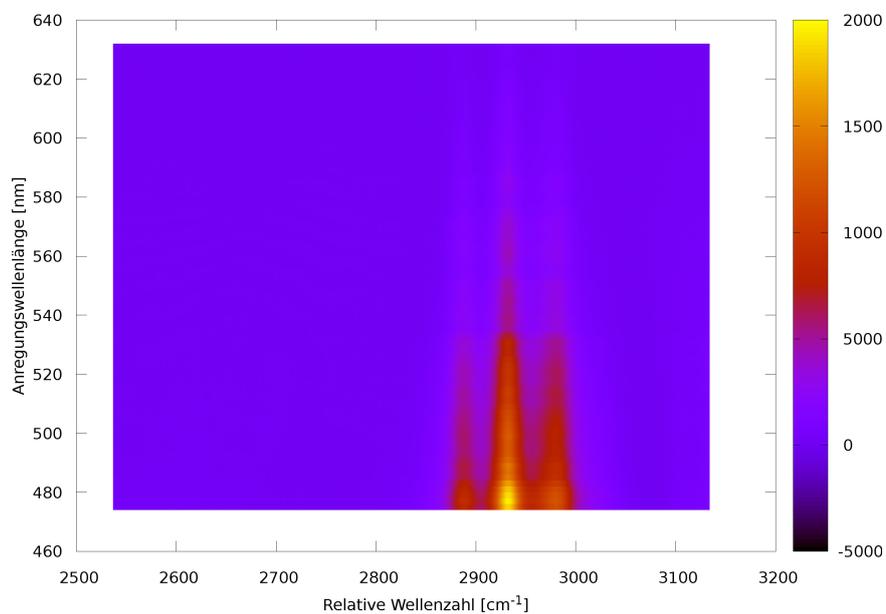


**Abbildung 9.3:** Ein spektraler Ausschnitt zum Angleichen des Wellenzahlenbereichs sämtlicher für eine Resonanzkarte von Ethanol verwendeter Ramanspektren.

bung der einzelnen Spektren gegeneinander, wodurch der von sämtlichen Einzelspektren abgedeckte Wellenzahlenbereich etwas eingeschränkt wird.

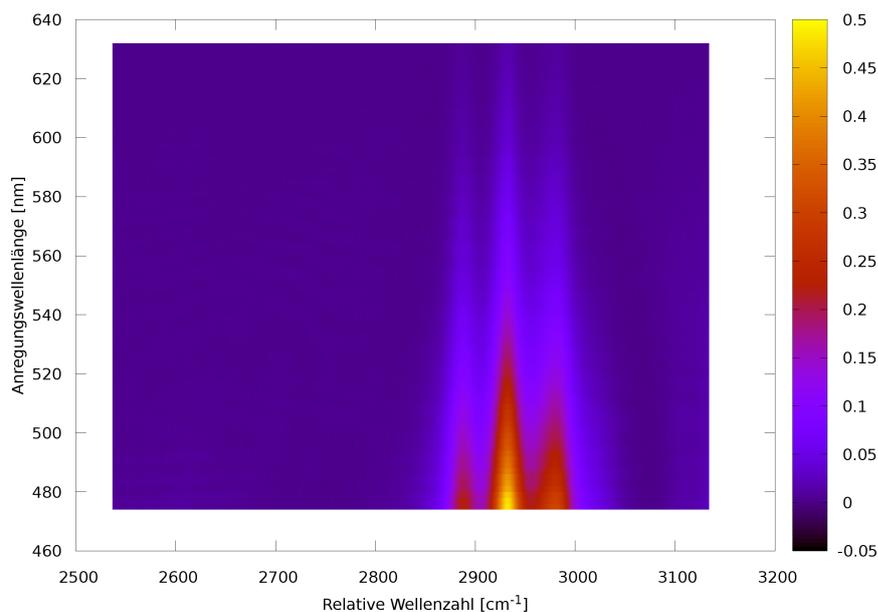


**Abbildung 9.4:** Spektren von Ethanol nach der Grundlinienkorrektur.



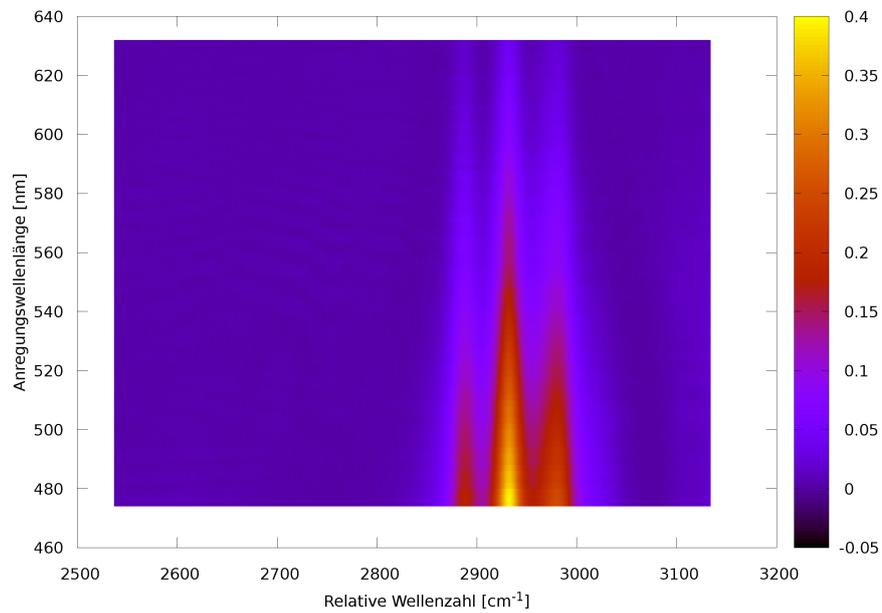
**Abbildung 9.5:** Durch Offsetkalibration zum Ausgleich von mechanischen Ungenauigkeiten im Spektrometer verschwinden die “Schlangenlinien” aus Abb. 9.4.

Die Pulsenergien des verwendeten optisch-parametrischen Oszillators sind wellenlängenabhängig und schwanken auch innerhalb einer gewählten Wellenlänge stark, so dass die Intensitäten der Ramanlinien in Abb. 9.5 noch “springen”. Werden die Intensitäten durch die für jedes einzelne Spektrum individuell gemessenen Pulsenergiesummen geteilt, ergibt sich ein realistischer Intensitätsverlauf der Ramanlinien über die Anregungswellenlängen hinweg (Abb. 9.6).



**Abbildung 9.6:** Energiekalibration durch Division der Intensitäten durch die für jedes Spektrum separat gemessene Pulsenergiesumme ergibt einen realistischen Intensitätsverlauf der Ramanlinien von Ethanol ohne Sprünge.

In Kap. 3 wurde gezeigt, dass die Ramanstreuung grundsätzlich von der vierten Potenz der Frequenz der anregenden Photonen abhängt. Um die Resonanzeffekte besonders deutlich sehen zu können, folgt als letzter Schritt noch eine Division durch die  $\omega^4$  Abhängigkeit der Ramanstreuung (Abb. 9.7), was den starken Anstieg der Ramanintensitäten hin zu kurzen Anregungswellenlängen (vgl. Abb. 9.6) verringert.



**Abbildung 9.7:** Division der Intensitäten durch die  $\omega^4$  Abhängigkeit der Ramanstreuung verringert den starken Anstieg der Intensitäten hin zu kurzen Anregungswellenlängen.

# Kapitel 10

## Resonanzprofile<sup>n</sup>

### 10.1 Experimentelle Vorbereitung

Die Algen *Chlorella vulgaris* (SAG 211-11b), *Haematococcus pluvialis* (SAG 34-1a) und *Porphyridium purpureum* (SAG 1380-1a) wurden wie in Kap. 7.6 beschrieben bei 22°C und einer Lichtintensität von  $2,5 \mu\text{mol} * \text{s}^{-1} * \text{m}^{-2}$  photosynthetisch aktiver Strahlung unter kontinuierlicher Belüftung angezogen. Da für die Photosynthese vor allem die Zahl der Photonen wichtig ist, nicht jedoch ihre Energie innerhalb des photosynthetisch nutzbaren Spektralbereiches, wird hier für die Bestrahlungsstärke zur besseren Vergleichbarkeit die eher in der biologischen Literatur verbreitete Einheit “Zahl der Photonen pro Zeit pro Fläche” anstelle der in der Physik üblicherweise verwendeten Einheit “Energie pro Zeit pro Fläche”  $W * \text{m}^{-2} = J * \text{s}^{-1} * \text{m}^{-2}$  verwendet. Die für die Anzucht gewählte Intensität liegt dabei in der Größenordnung des Lichtkompensationspunktes<sup>92</sup>, der geringsten Intensität, bei der eine Alge wachsen kann. Auch während der Messungen wurde die Temperatur konstant bei 22°C gehalten.

Um auch außerhalb des Resonanzbereiches der Carotinoide Ramanspektren mit einem akzeptablen Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten, sind gleichbleibend hohe Zelldichten nötig. Diese werden nach Absetzen der Zellen aus 2 ml gut durchmischter Algenkultur auf dem Boden einer Quarzglasküvette (117.104-QS, Hellma Analytics GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland) erreicht.

Zur Vorbereitung gestresster Kulturen von *Haematococcus pluvialis* und *Porphyridium purpureum* wurden mit diesen Arten gefüllte Anzuchtgefäße für längere Zeit im Reaktor belassen, ohne regelmäßig verbrauchtes Medium auszutauschen, was zu Stress durch

---

<sup>n</sup>Der Text und alle Bilder in diesem Kapitel wurden bereits vorab in ähnlicher Form unter dem Titel “In vivo determination of carotenoid resonance excitation profiles of *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, and *Porphyridium purpureum*” im Journal of Raman Spectroscopy publiziert<sup>91</sup>.

Nährstoffmangel führt<sup>13,77</sup>. Verschiedene Stresszustände lassen sich durch Beobachtung der Farbe der Kultur unterscheiden, ähnlich wie für *Haematococcus pluvialis* in<sup>80</sup> beschrieben.

Bei *Chlorella vulgaris* wurde Lichtstress gewählt, um durch den Vergleich von lichtgestressten mit dunkeladaptierten Kulturen mögliche Hinweise auf eine Reaktion des Violaxanthinzyklus aufzudecken. Zur Dunkeladaption von *Chlorella vulgaris* wurde die Kultur in einer Flasche für einen Tag vor Beginn der Experimente in völliger Dunkelheit aufbewahrt. Da sich Algenzellen am Boden der für die Ramanmessung verwendeten Quarzglas-küvette nicht bewegen, wurde für jedes einzelne gemessene Ramanspektrum der dunkeladaptierten Kultur jeweils eine neue Probe von je 2 ml aus der direkt vor der Entnahme geschüttelten und ansonsten in Dunkelheit aufbewahrten Kulturflasche entnommen, um kurzfristige Lichtanpassungen infolge des für die Anregung verwendeten Laserstrahles zu vermeiden.

Um den Einfluss von Lichtstress auf *Chlorella vulgaris* untersuchen zu können, wurde eine Probe von 2 ml für einen Tag vor Beginn der Experimente einer Lichtintensität von  $1950 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$  photosynthetisch aktiver Strahlung ausgesetzt, wobei die Probe zwischen den Messungen der einzelnen Ramanspektren jeweils wieder der hohen Lichtintensität ausgesetzt wurde, um den Stresszustand über den Verlauf der Messungen hinweg beizubehalten. Die zur Stressinduktion gewählte Intensität orientierte sich dabei an den in<sup>93</sup> gegebenen Werten.

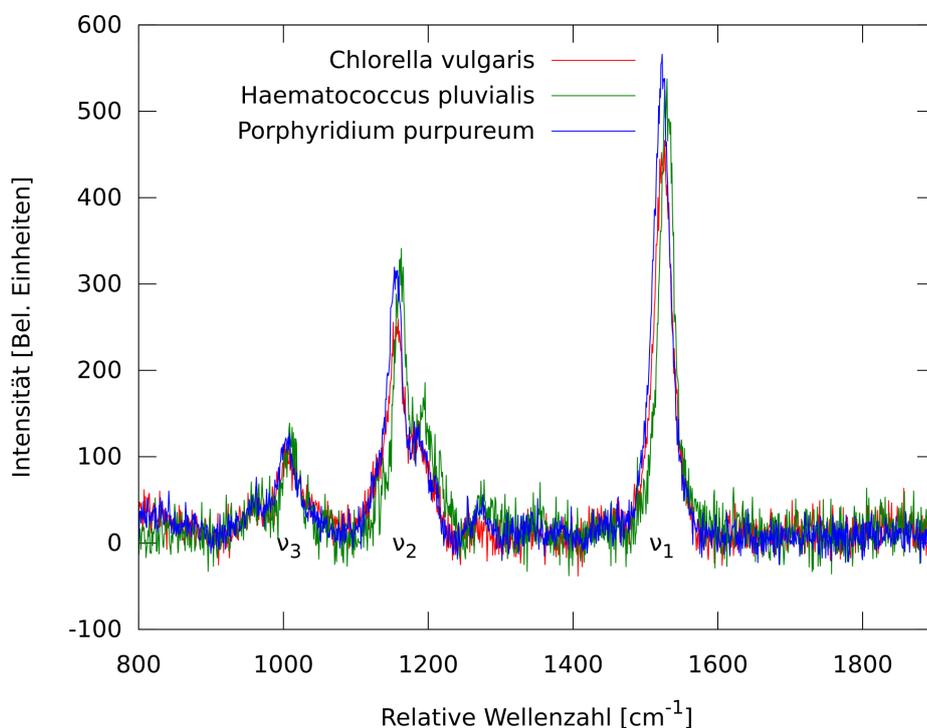
Da die Dunkel-Hell-Anpassung der Grünalge *Dunaliella salina* innerhalb von 3,2 Minuten geschieht (siehe Kap. 11)<sup>94</sup> und bei der verwandten Art *Chlorella pyrenoidosa* mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie ein Gleichgewicht der Reaktion des Violaxanthinzyklus nach einem Hell-Dunkel-Übergang innerhalb von 30 Minuten gemessen worden ist<sup>95</sup>, kann sicher angenommen werden, dass ein Gleichgewichtszustand nach einem Tag absoluter Dunkelheit bzw. intensiver Beleuchtung erreicht wird.

## 10.2 Ergebnisse und Diskussion

Mit dem morphologischen Algorithmus (Kap. 6) grundlinienkorrigierte Ramanspektren von den drei verwendeten Algenarten sind in Abb. 10.1 zu sehen, wobei die stärksten zu beobachtenden Signale Carotinoidlinien sind. Für jede der in diesem Kapitel gezeigten Resonanzkarten wurden 46 Ramanspektren aufgenommen.

Die Resonanzkarten der beiden Grünalgen *Haematococcus pluvialis* und *Chlorella vulgaris* in ihrem ungestressten, grünen Zustand sind sehr ähnlich, ebenso die daraus extrahierten Resonanzprofile (Abb. 10.2b and 10.3b). Im Vergleich dazu hat die Rotalge *Porphyridium purpureum*, welche nur die beiden Carotinoide  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin

besitzt, ihr Resonanzmaximum im ungestressten Zustand bei 505 nm anstelle von 495 nm (*Chlorella vulgaris*) oder 500 nm (*Haematococcus pluvialis*).



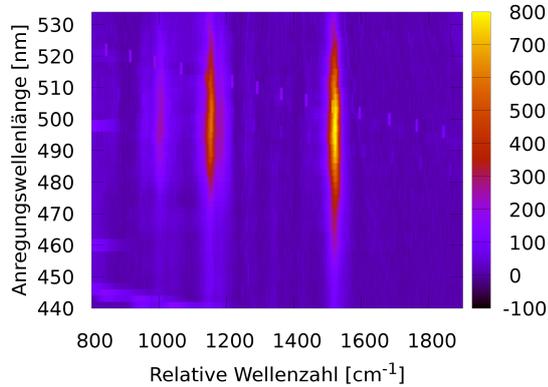
**Abbildung 10.1:** Grundlinienkorrigierte, mit 480 nm angeregte Ramanspektren der Algen *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis* und *Porphyridium purpureum* im ungestressten, grünen Zustand.

### 10.2.1 *Chlorella vulgaris*

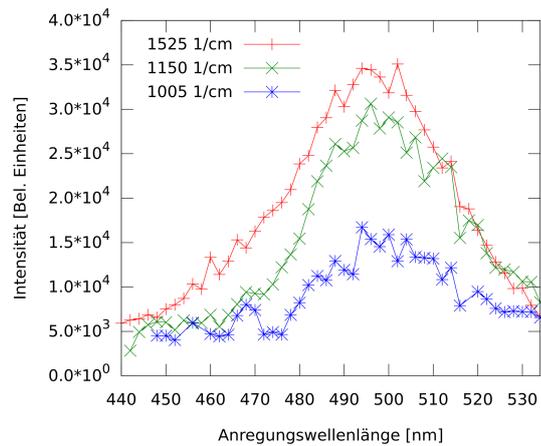
Um nach Hinweisen auf eine Reaktion des Violaxanthinzyklus zu suchen, wurde *Chlorella vulgaris* in zwei Zuständen untersucht: Dunkeladaptiert und lichtgestresst. Da die durch Lichtstress induzierte Umwandlung von Violaxanthin in Zeaxanthin mit einer Verschiebung der Resonanz hin zu längeren Wellenlängen einhergeht<sup>12</sup>, sollte sich dies auch im Vergleich der beiden Resonanzkarten widerspiegeln.

Die Resonanzprofile für die dunkeladaptierte (Abb. 10.2a) und lichtgestresste (Abb. 10.2c) Probe von *Chlorella vulgaris* sind jedoch ähnlich (Abb. 10.2b und 10.2d) und zeigen beide ein Resonanzmaximum bei 500 nm. Die Resonanzprofile aller drei Linien bei  $\nu_1$  ( $1525\text{ cm}^{-1}$ ),  $\nu_2$  ( $1150\text{ cm}^{-1}$ ) und  $\nu_3$  ( $1005\text{ cm}^{-1}$ ) zeigen einen ähnlichen Verlauf.

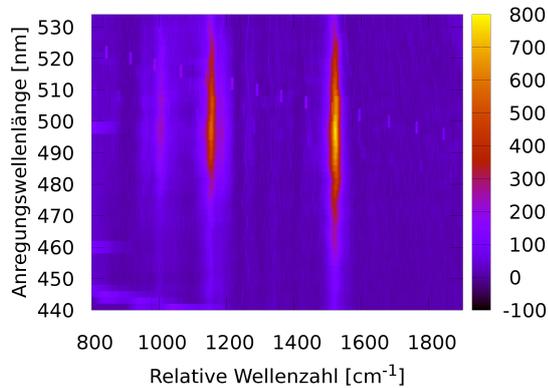
Im Laufe eines Tages kann *Chlorella vulgaris* keine sekundären Carotinoide synthetisieren<sup>70</sup>, eine Reaktion des Violaxanthinzyklus ist jedoch innerhalb dieser Zeit zu erwarten. Allerdings konnten keine derartigen Hinweise im Vergleich der Resonanzprofile (Abb. 10.2b



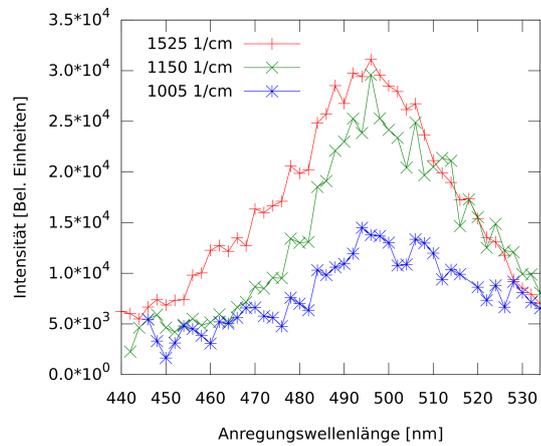
(a) Dunkeladaptierte Probe



(b) Aus (a) bestimmte Resonanzprofile



(c) Lichtgestresste Probe



(d) Aus (c) bestimmte Resonanzprofile

**Abbildung 10.2:** Resonanzkarten (a, c) und daraus bestimmte Resonanzprofile (b, d) der Carotinoid-Ramanlinien bei  $1525\text{ cm}^{-1}$ ,  $1150\text{ cm}^{-1}$  und  $1005\text{ cm}^{-1}$  von zwei unterschiedlichen Zuständen von *Chlorella vulgaris*.

und 10.2d) gefunden werden, was vermutlich auf den relativ zur Gesamtmenge an Carotinoiden kleinen Anteil des Violaxanthinzyklus in dieser Art zurückzuführen ist<sup>70</sup>.

### 10.2.2 *Haematococcus pluvialis*

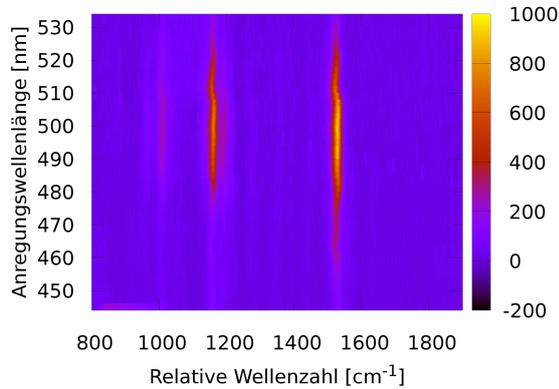
*Haematococcus pluvialis* wurde in drei Zuständen untersucht: Ungestresst grün, leicht gestresst rötlich und stark gestresst rot.

Im ungestressten grünen Zustand zeigt *Haematococcus pluvialis* (Abb. 7.2a und 10.3a) ein Resonanzmaximum bei 500 nm, wobei die Resonanzprofile der beiden Carotinoidramanlinien bei  $\nu_1$  ( $1525\text{ cm}^{-1}$ ) und  $\nu_2$  ( $1150\text{ cm}^{-1}$ ) eine ähnliche Form aufweisen (Abb. 10.3b).

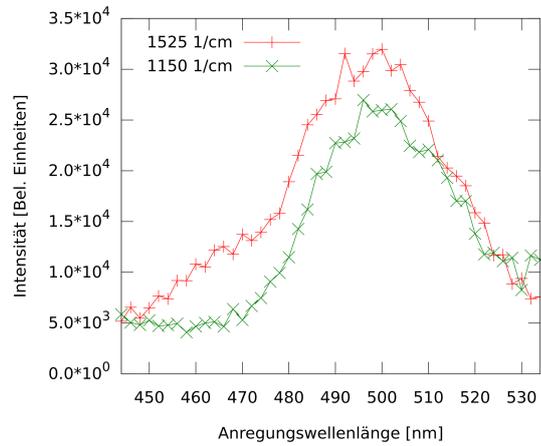
*Haematococcus pluvialis* ist dafür bekannt, bei Stickstoffmangel<sup>77</sup> große Mengen des sekundären Carotinoids Astaxanthin zu synthetisieren<sup>15</sup> (Abb. 7.2b und 10.3c). Das Astaxanthin führt zu einer Verstärkung der Carotinoidresonanz im Bereich von 510 nm und darüber, ohne jedoch die Form der Resonanzprofile hin zu kürzeren Wellenlängen zu verändern (Abb. 10.3d).

In komplett roten Zellen schirmt das in großer Menge in der Zellwand eingelagerte Astaxanthin die innerhalb der Zelle liegenden Carotinoide optisch ab (Abb. 7.2c und 10.3e). Dies ergibt ein Resonanzprofil, dessen Maximum oberhalb des in diesem Experiment mit den vorhandenen Kantenfiltern durchgängig zugänglichen Wellenlängenbereiches liegt (Abb. 10.3f). Wenngleich Lösungsmittelleffekte zu beachten sind, ist dies mit der Arbeit von Salares *et. al.*<sup>96</sup> zu vergleichen, worin für reines, in Chloroform gelöstes Astaxanthin bei Raumtemperatur ein Resonanzmaximum nahe bei 520 nm gefunden wurde.

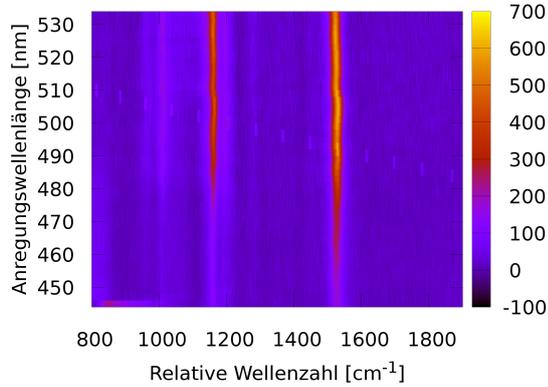
Wie ein Vergleich der Abbildungen 10.3b, 10.3d und 10.3f zeigt, verschiebt sich das Resonanzmaximum der Carotinoidramanlinien mit steigendem Astaxanthingehalt hin zu größeren Wellenlängen. Eine Überwachung der Astaxanthinproduktion in einer Kultur von *Haematococcus pluvialis* mit Hilfe der Carotinoid-Resonanzprofile wird dadurch ermöglicht.



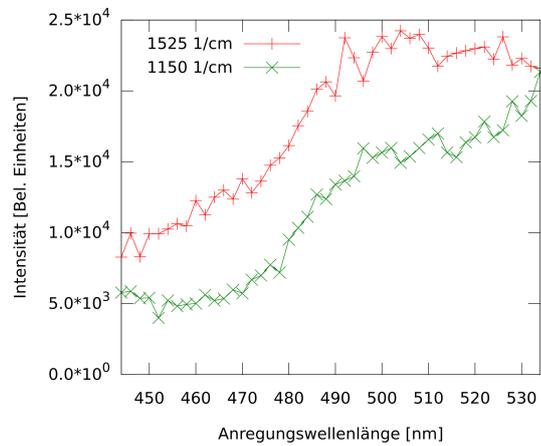
(a) Ungestresste, grüne Probe



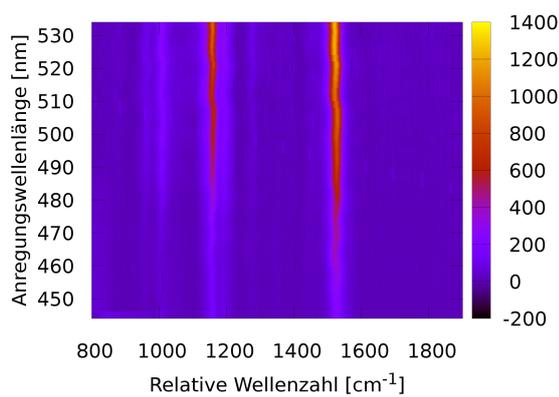
(b) Aus (a) bestimmte Resonanzprofile



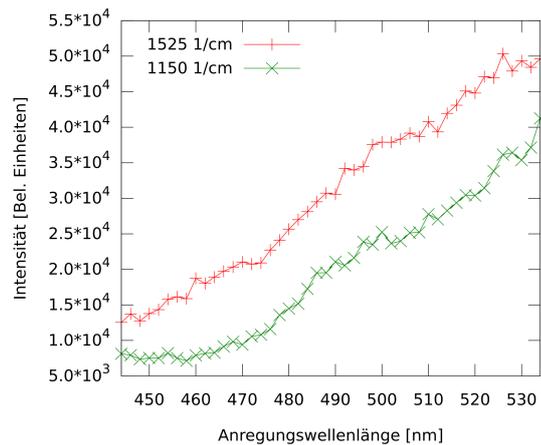
(c) Leicht gestresste, rötliche Probe



(d) Aus (c) bestimmte Resonanzprofile



(e) Stark gestresste, rote Probe



(f) Aus (e) bestimmte Resonanzprofile

**Abbildung 10.3:** Resonanzkarten (a) einer ungestressten, grünen, (c) einer leicht gestressten, rötlichen und (e) einer stark gestressten, roten Probe einer *Haematococcus pluvialis* Kultur, sowie daraus bestimmte Resonanzprofile (b, d, f).

### 10.2.3 *Porphyridium purpureum*

*Porphyridium purpureum* wurde in drei Zuständen untersucht: Ungestresst grün, leicht gestresst braun und stark gestresst rot.

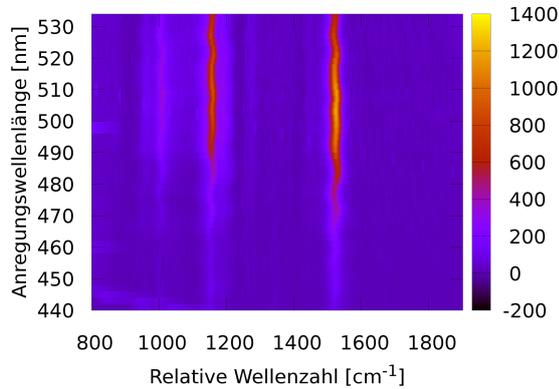
Im ungestressten, grünen Zustand (Abb. 10.4a) zeigt *Porphyridium purpureum* ein Resonanzmaximum nahe bei 505 nm (Abb. 10.4b), welches etwas breiter ist als die Resonanzmaxima der Proben von *Chlorella vulgaris* (Abb. 10.2b und 10.2d) und der ungestressten, grünen Probe von *Haematococcus pluvialis* (Abb. 10.3b).

Unter Stress kann *Porphyridium purpureum* große Mengen des roten, auf Proteinen basierenden Pigmentes Phycoerythrin synthetisieren<sup>13</sup>. Die braune Farbe der zweiten Probe kommt daher, dass sich in der nur leicht gestressten Kultur auch noch restliche grüne Zellen befinden (Abb. 10.4c). Obwohl Phycoerythrin kein Carotinoid ist, zeigen die Resonanzprofile der Carotinoidlinien (Abb. 10.4d) eine beträchtliche Verschiebung des Resonanzmaximums über 530 nm hinaus.

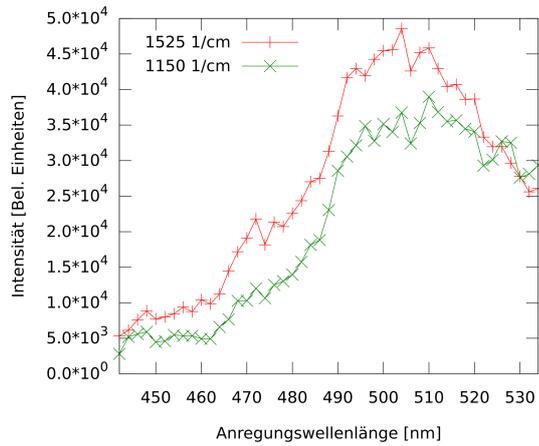
Weiterer Stress führt schließlich zu einer komplett roten Probe mit großen Mengen von Phycoerythrin, in der keine grünen Zellen mehr vorhanden sind (Abb. 10.4e). Die Resonanzkarten verändern sich beim Übergang vom braunen zum komplett roten Zustand nicht, ebenso sind die entsprechenden Resonanzprofile (Abb. 10.4d und 10.4f) vergleichbar. Dies bedeutet, dass der maximale Stress in Hinblick auf die Carotinoidresonanz bereits im braunen Zustand erreicht ist oder aber dass die PhycoerythrinKonzentration nicht direkt mit den Carotinoid-Resonanzprofilen korreliert.

Absorptions- und Ramanspektren von  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin sind sehr ähnlich<sup>97,98</sup>. Da Resonanzprofile eng mit Absorptionsspektren zusammenhängen<sup>10,96</sup>, ist zu erwarten, dass auch die Resonanzprofile von  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin ähnlich sind. Demnach kann die beobachtete Verschiebung des Resonanzmaximums nicht allein durch eine Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin oder umgekehrt erklärt werden. Ramanlinien von Phycobiliproteinen wie Phycoerythrin unterscheiden sich von Carotinoidlinien<sup>99</sup>, sind aber vergleichsweise schwach und wurden hier nicht beobachtet.

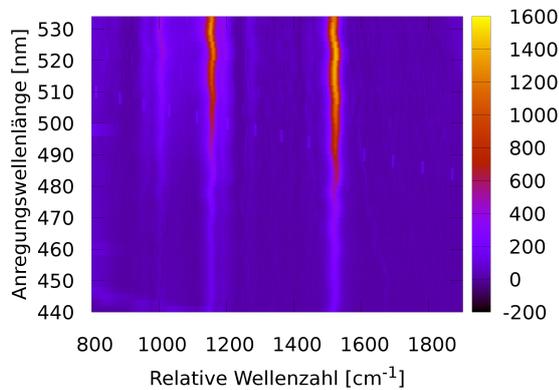
Da *Porphyridium purpureum* Phycoerythrin in den Thylakoidmembranen<sup>100</sup> zur Photosynthese in grünem Licht verwendet<sup>82</sup> und auch  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin in den Thylakoidmembranen enthalten sind<sup>101</sup>, ist eine Veränderung der Umgebung der Carotinoide infolge der Phycoerythrinsynthese unter Stressbedingungen denkbar. Dies würde die beobachtete Verschiebung des Resonanzmaximums der Carotinoidlinien vom ungestressten grünen hin zum braunen bzw. roten gestressten Zustand erklären, müsste aber durch weitere Experimente genauer untersucht werden, die den Rahmen dieser Arbeit sprengen würden.



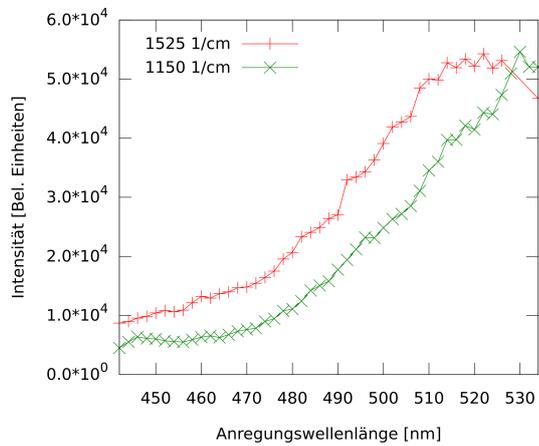
(a) Ungestresste, grüne Probe



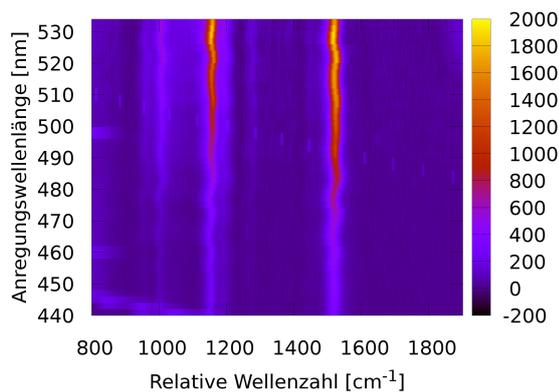
(b) Aus (a) bestimmte Resonanzprofile



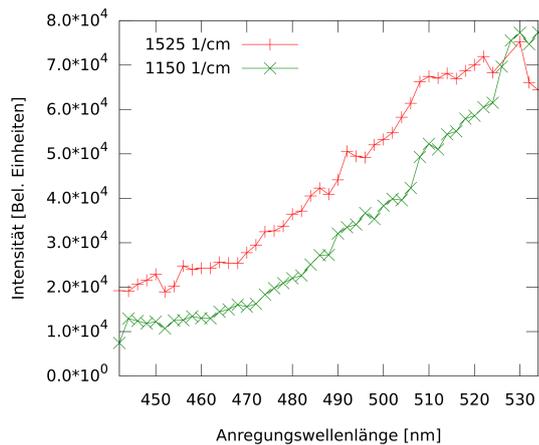
(c) Leicht gestresste, braune Probe



(d) Aus (c) bestimmte Resonanzprofile



(e) Stark gestresste, rote Probe



(f) Aus (e) bestimmte Resonanzprofile

**Abbildung 10.4:** Resonanzkarten (a) einer ungestressten, grünen, (c) einer leicht gestressten, braunen und (e) einer stark gestressten, roten Probe einer *Porphyridium purpureum* Kultur, sowie daraus bestimmte Resonanzprofile (b, d, f).

## 10.3 Zusammenfassung

Von den drei Algenarten *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis* und *Porphyridium purpureum* wurden in verschiedenen Stresszuständen Resonanzkarten gemessen und daraus Resonanzprofile bestimmt:

- Bei *Chlorella vulgaris* konnte keine Veränderung der Resonanzkarte durch Lichtstress gemessen werden, was vermutlich auf den relativ zur Gesamtmenge an Carotinoiden kleinen Anteil des Violaxanthinzyklus in dieser Art zurückzuführen ist<sup>70</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurde kein Zugang zum Violaxanthinzyklus basierend auf Resonanzkarten gefunden.
- Bei *Haematococcus pluvialis* konnte wie erwartet die hier durch Nährstoffmangel induzierte Synthese des sekundären Carotinoids Astaxanthin<sup>15</sup> deutlich in den Resonanzkarten verfolgt werden, wobei sich die Resonanzmaxima mit zunehmender Astaxanthinkonzentration zum Roten hin verschieben. Dies ist in guter Übereinstimmung mit dem für reines, in Chloroform gelöstem Astaxanthin publizierten Resonanzprofil<sup>96</sup>.
- Bei *Porphyridium purpureum* wurde einhergehend mit dem Beginn der Phycoerythrinsynthese eine Veränderung der Resonanzprofile der Carotinoide beobachtet. Die anschließend stressbedingt weiter ansteigende Phycoerythrinkonzentration führte nicht zu einer weiteren Rotverschiebung der Resonanzmaxima der Carotinoidlinien. Weitere physiologische Experimente müssen klären, weswegen sich die Resonanzmaxima der Carotinoidlinien bei einsetzender Phycoerythrinsynthese verschieben.



# Kapitel 11

## Kinetik des Violaxanthinzyklus von *Dunaliella salina*<sup>o</sup>

### 11.1 Experimentelles

Die Grünalge *Dunaliella salina* (SAG 184.80) wurde wie in Kap. 7.6 beschrieben bei 22°C und einer Lichtintensität von  $2,5 \mu\text{mol} * \text{s}^{-1} * \text{m}^{-2}$  photosynthetisch aktiver Strahlung unter kontinuierlicher Belüftung vermehrt und durch regelmäßiges Verdünnen der Kultur mit frischem Medium in der exponentiellen Wachstumsphase gehalten. Auch während der Messungen wurde die Temperatur konstant bei 22°C gehalten.

Für jedes Experiment wurden je 200 ml der Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase in 250 ml Erlenmeyerkolben abgefüllt und mit einem magnetischen Rührfisch versehen, wobei die in einer Thoma-Zählkammer bestimmte mittlere Zelldichte in der Größenordnung von  $1,5 * 10^6$  Zellen/ml lag, was sich als Kompromiss zwischen gleichmäßiger Stressbeleuchtung bei geringen Zelldichten und einem guten Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Ramanlinien bei hohen Zelldichten bewährt hat. Zur Wellenlängenkalibration wurden in eine Plexiglasplatte eingelassene Neonglimmlampen verwendet (Abb. 5.4 und 5.6).

Für die Stressbeleuchtung wurden eine rote und eine blaue Hochleistungsleuchtdiode (Luminous Devices, Woburn, USA, Phlatlight LEDs CBT-90-RX-L15-BN101 für rote Bestrahlung zwischen 611 - 631 nm sowie CBT-90-B-L11-J101 für blaue Bestrahlung zwischen 450 - 470 nm) auf einem Kühlkörper montiert und direkt an der Glaswand des Kolbens platziert. Die Intensität der Stressbeleuchtung wurde auf  $3000 \mu\text{mol} * \text{s}^{-1} * \text{m}^{-2}$

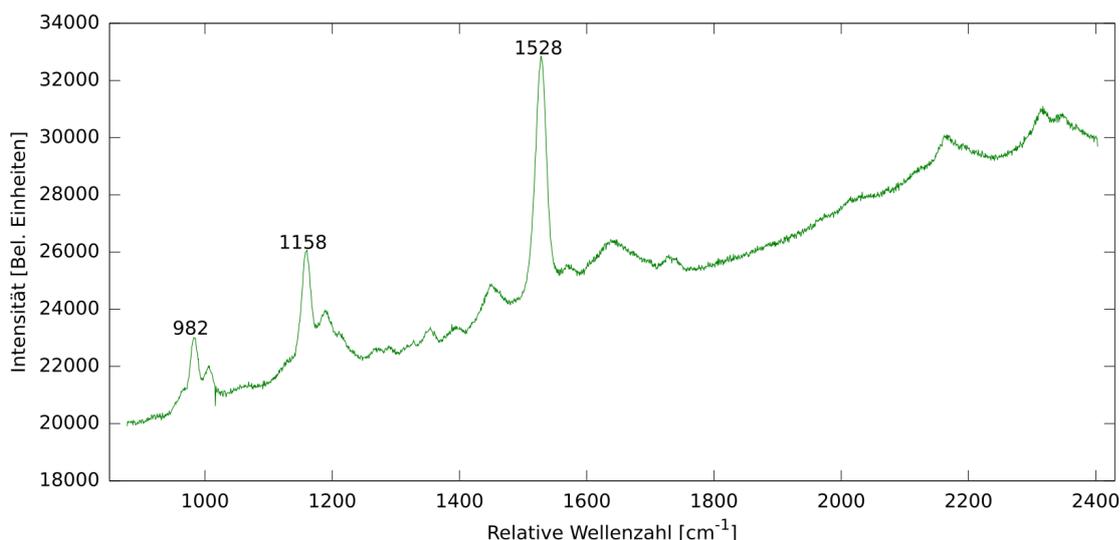
---

<sup>o</sup>Der Text und alle Bilder in diesem Kapitel wurden bereits vorab in ähnlicher Form unter dem Titel "Violaxanthin cycle kinetics analysed *in vivo* with resonance Raman spectroscopy" im Journal of Raman Spectroscopy publiziert<sup>94</sup>.

Photonen photosynthetisch aktiver Strahlung an der Außenwand des Glaskolbens eingestellt, welche mit einem Li-190SA Quantensensor (Li-Cor, Lincoln, USA) bestimmt wurde. Der genaue zeitliche Ablauf der Bestrahlung variierte von Experiment zu Experiment und ist deshalb für jeden Versuchsansatz gesondert angegeben.

Die Anregungswellenlänge von 473 nm des verwendeten Dauerstrichlasers liegt nahe des 0-0 Überganges von Violaxanthin und innerhalb der Soret-Bande von Chlorophyll b, ist allerdings weit von dem 0-0 Übergang von Zeaxanthin entfernt, für dessen Anregung zum Beispiel die 514,5 nm Linie eines Argon-Ionen-Lasers gut geeignet wäre<sup>12</sup>.

Es wurden je 20 Aufnahmen mit einer Sekunde Belichtungszeit akkumuliert. Zusammen mit der zum Auslesen des Kamerachips nötigen Zeit konnte so alle 20,885 s ein Spektrum aufgenommen werden. Ein typisches, unbearbeitetes Spektrum ist in Abb. 11.1 zu sehen. Nach Kalibration der Wellenlängen mit Neonspektrallinien wurde das Gitter nicht mehr bewegt, außerdem wurde die Kalibration regelmäßig durch erneute Messung der Neonspektrallinien überprüft.



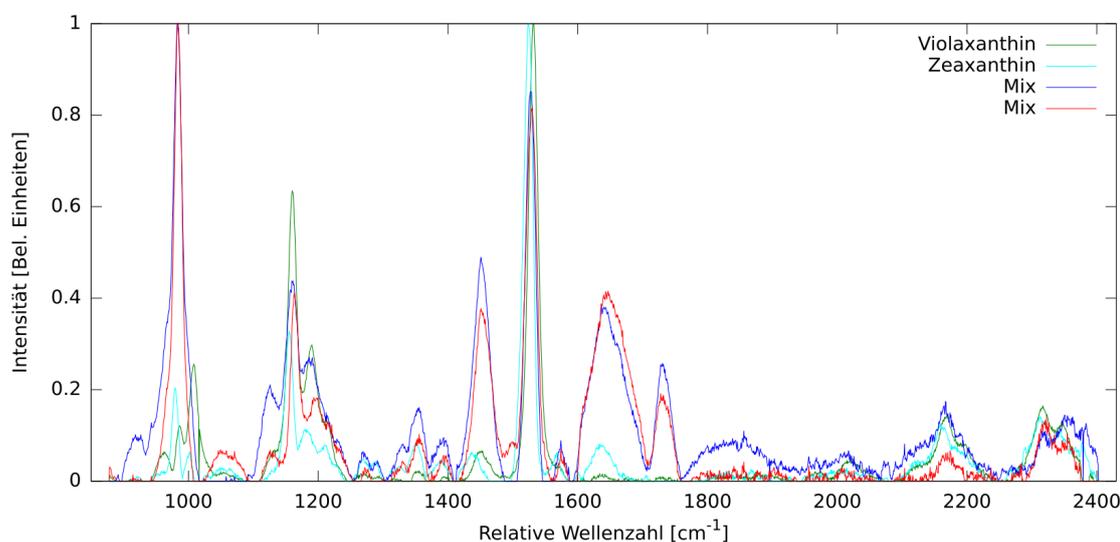
**Abbildung 11.1:** Ein typisches, unbearbeitetes Ramanspektrum einer dunkeladaptierten Kultur von *Dunaliella salina* mit einer Anregungswellenlänge von 473 nm. Die stärksten hier sichtbaren Signale sind die Banden  $\nu_1$  (1528  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\nu_2$  (1158  $\text{cm}^{-1}$ ) und  $\nu_3$  (982  $\text{cm}^{-1}$ ) der in den Algenzellen enthaltenen Carotinoide. Chlorophyllbanden sind zwischen 1600  $\text{cm}^{-1}$  und 1800  $\text{cm}^{-1}$  zu sehen. Der hier gut erkennbare Fluoreszenzhintergrund wurde anschließend mit der morphologischen Grundlinienkorrektur entfernt.

Um eine Beeinflussung oder Lichtadaption der Kultur infolge der Ramanmessung auszuschließen, wurde das Faserbündel frei in der gerührten Kultur positioniert (Abb. 5.4), so dass einzelne Zellen nur für sehr kurze Zeit mit dem Anregungsstrahl in Berührung gekommen sind. Im Strahl war eine gleichmäßige dunkelrote Chlorophyllfluoreszenz zu beobachten und die Kultur konnte unter diesen Bedingungen für mehrere Tage ohne erkennbare Stresszustände gehalten werden.

Die gemessenen Daten wurden anschließend wie in den Kapiteln 6 und 4 beschrieben von der Grundlinie befreit und in Hauptkomponenten zerlegt.

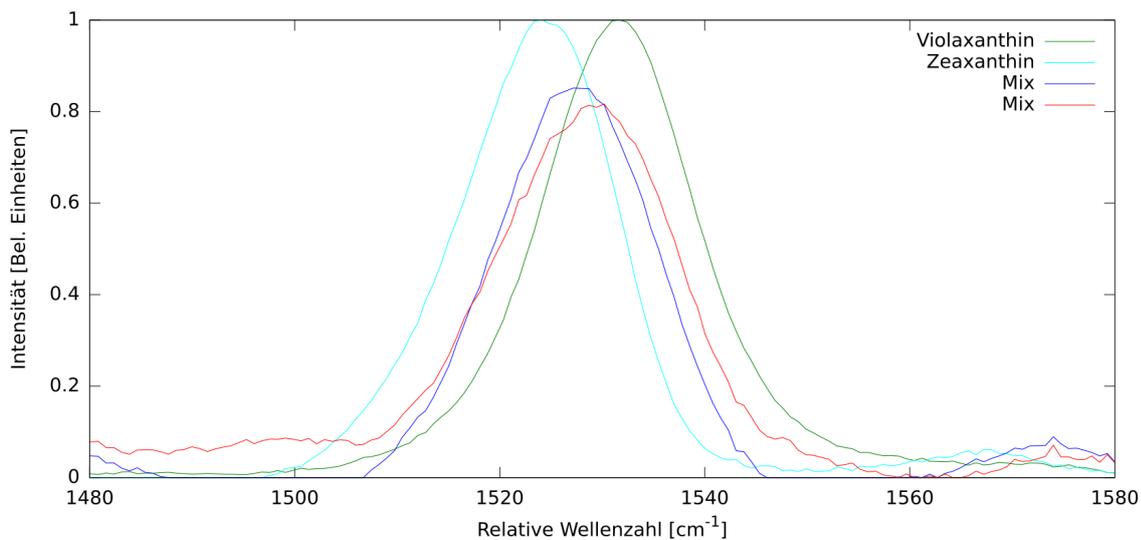
## 11.2 Einblick in den Violaxanthinzyklus mittels Hauptkomponentenzerlegung

Für ein einleitendes Experiment wurden 200 ml Kultur von *Dunaliella salina* abwechselnd 42 Minuten lang blauer Stressbeleuchtung und 459 Minuten Dunkelheit ausgesetzt. Die sich aus acht solcher Hell-Dunkel-Zyklen mit Hauptkomponentenzerlegung ergebenden Ramanspektren sind in den Abbildungen 11.2 und 11.3 zu sehen.

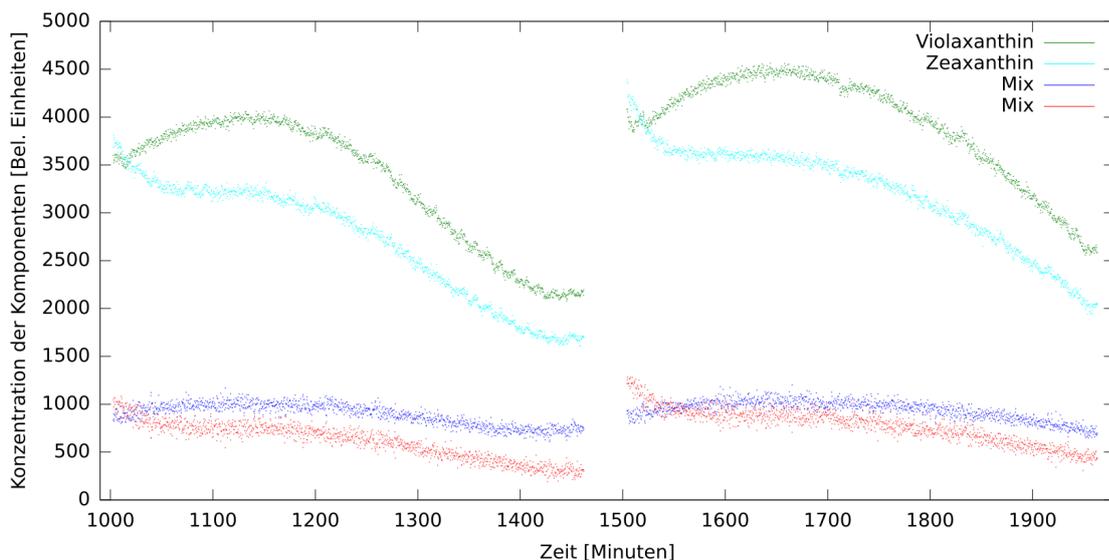


**Abbildung 11.2:** Spektren von Violaxanthin (grün), Zeaxanthin (türkis) sowie von zwei weiteren Komponenten (rot und blau), die das Chlorophyll und weitere, nicht direkt am Violaxanthinzyklus beteiligte Carotinoide von *Dunaliella salina* repräsentieren. Acht Hell-Dunkel-Zyklen wurden hierfür mittels Hauptkomponentenzerlegung analysiert.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der spektralen Zerlegung durch Ruban *et. al.*<sup>12</sup> wurde eine Zerlegung in vier Komponenten verwendet. Zwei davon, die in den Legenden als “Mix” bezeichnet werden, zeigen wie erwartet während der Reaktion des Violaxanthinzyklus nur geringfügige Änderungen (Abb. 11.4). Diese beiden Komponenten repräsentieren Mischungen aus Chlorophyll (wegen Anregung in dessen Soret-Bande wahrscheinlich hauptsächlich Chlorophyll b) und verschiedener Carotinoide, die in den Algenzellen enthalten sind, jedoch nicht direkt mit dem Violaxanthinzyklus zusammenhängen. Diese können mit der Hauptkomponentenzerlegung jedoch nicht weiter zur Identifikation aufgespalten werden, da der Algorithmus nur sich relativ zueinander verändernde spektrale Komponenten zerlegen kann. Der Linienposition nach ist allerdings zu vermuten, dass Lutein einen wesentlichen Anteil ausmacht<sup>12</sup>.



**Abbildung 11.3:** Detailansicht der  $\nu_1$  Ramanlinien bei  $1525 \text{ cm}^{-1}$ . Die Linienlage von Violaxanthin (grün) und Zeaxanthin (türkis) ist deutlich zu unterscheiden.



**Abbildung 11.4:** Der mit Hauptkomponentenzerlegung bestimmte zeitliche Verlauf der Konzentrationen von Violaxanthin (grün), Zeaxanthin (türkis) sowie von zwei weiteren Komponenten (rot und blau), die das Chlorophyll und weitere, nicht direkt am Violaxanthinzyklus beteiligte Carotinoide von *Dunaliella salina* repräsentieren. Spektren ließen sich nur während der Dunkelphase auswerten, so dass während der Beleuchtungsphase keine Datenpunkte zur Verfügung stehen. In beiden Wiederholungen ist nach Ende der Beleuchtung ein Abfall der Zeaxanthinkonzentration zusammen mit einem Anstieg der Violaxanthinkonzentration zu erkennen, was der Hell-Dunkel-Anpassung entspricht. Anschließend ist ein deutlicher Abfall sowohl von Violaxanthin als auch von Zeaxanthin zu beobachten, was einer Anpassung der Gesamtcarotinoidkonzentration gleich kommt.

Ein Vergleich mit Ramanspektren von isolierten Carotinoiden erscheint angebracht, da die Hauptkomponentenzerlegung die Ramanspektren einzelner Komponenten liefert. Durch Lösungsmittelleffekte können die Linienlagen isolierter Carotinoide von denen in biologischem Gewebe abweichen<sup>11</sup>, wobei allerdings Pyridin dafür bekannt ist, die Linienlagen der Carotinoide in biologischem Gewebe gut wiederzugeben<sup>38</sup>. Die aus der Hauptkomponentenzerlegung hervorgehenden Positionen der  $\nu_1$ -Bande von  $1524\text{ cm}^{-1}$  für Zeaxanthin und  $1531\text{ cm}^{-1}$  für Violaxanthin stimmen gut mit den von Ruban *et. al.* in<sup>12</sup> gegebenen Werten für isoliertes Zeaxanthin ( $1522\text{ cm}^{-1}$ ) und isoliertes Violaxanthin ( $1529\text{ cm}^{-1}$ ) in Pyridinlösung bei einer Anregungswellenlänge von  $473\text{ nm}$  überein.

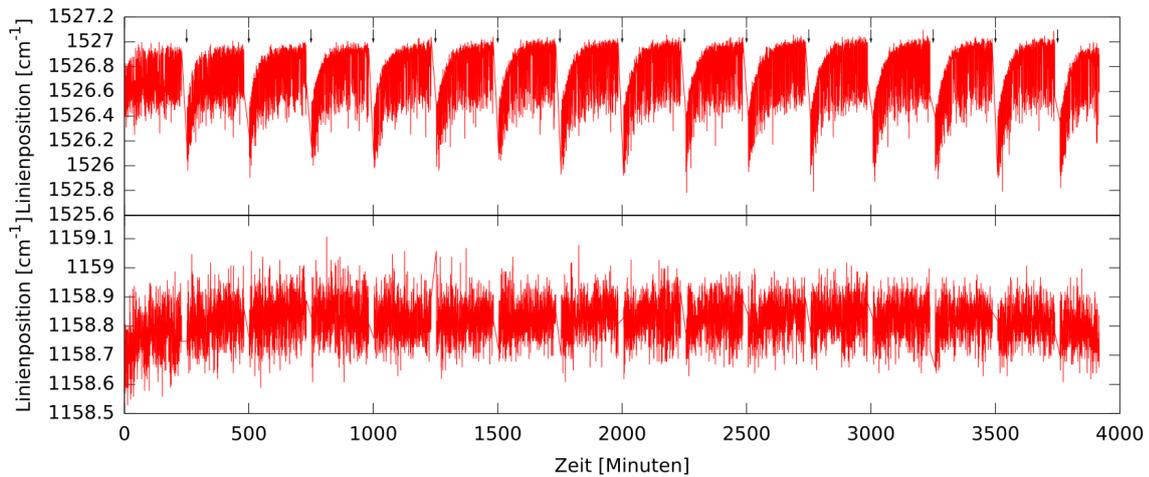
Auch während der Stressbeleuchtung wurden Ramanspektren aufgenommen, die verwendete blaue Stresslichtquelle überstrahlte jedoch sämtliche Ramanlinien in den Aufnahmen. Künftige Experimente können von einem weiteren Filter zwischen der für die Stressbeleuchtung verwendeten Leuchtdiode und der Algenkultur profitieren, dessen spektraler Durchlassbereich nicht mit dem des Rayleigh-Tiefpassfilter am Eingang des Spektrometers überlappt.

Wie in Abb. 11.4 zu sehen beginnt direkt nach Ende der Stressbeleuchtung die Hell-Dunkel-Adaption in Form einer sinkenden Zeaxanthinkonzentration im Kombination mit einer steigenden Violaxanthinkonzentration. Der zeitliche Verlauf ist dabei mit der von Jahns an Erbsenpflanzen beobachtete Kinetik<sup>6</sup> vergleichbar und wird in den folgenden Experimente noch näher untersucht. Anschließend ist ein gemeinsames Absinken der Konzentrationen von Violaxanthin und Zeaxanthin zu beobachten, welches einer Reduktion der Regelkapazität des Violaxanthinzyklus in längeren Dunkelphasen entspricht. Solche Anpassungen der Regelkapazität sind in der Literatur bekannt, allerdings mit einer typischen Dauer von einigen Tagen, wie von Nichelmann *et. al.* beschrieben<sup>28</sup>.

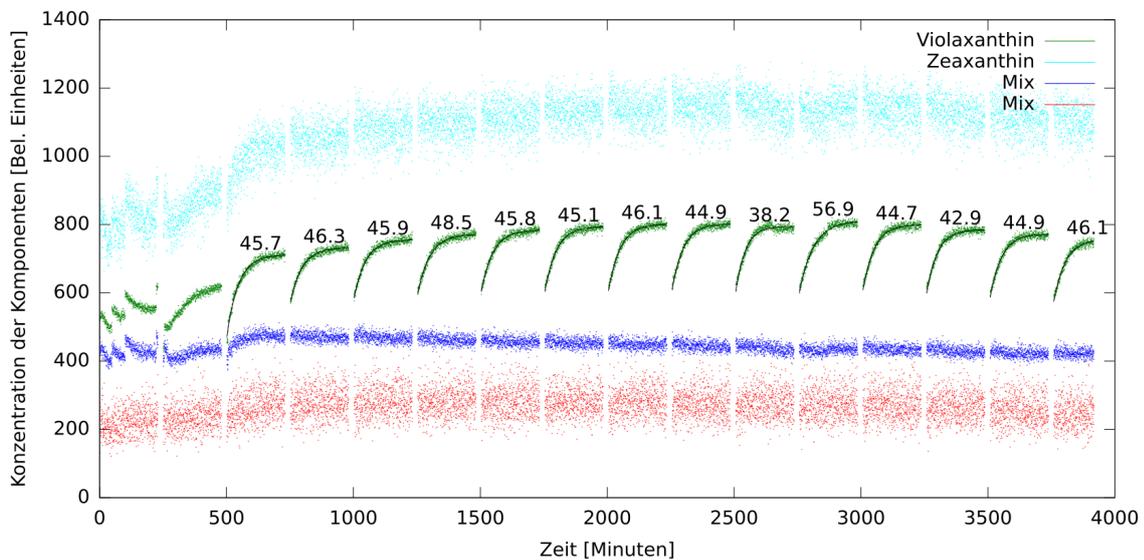
## 11.3 Kinetik der Hell-Dunkel-Adaption

Zur genauen Bestimmung der Reaktionszeit des Violaxanthinzyklus von *Dunaliella salina* wurde die Hell-Dunkel-Adaption in mehreren Zyklen bestehend aus 21 Minuten blauer Stressbeleuchtung und 230 Minuten darauf folgender Dunkelheit untersucht (Abb. 11.5 und 11.6).

Um die Messungen mit vorhandener Literatur zum Violaxanthinzyklus vergleichen zu können, wurden zunächst die Positionen der  $\nu_1$  und  $\nu_2$  Banden sämtlicher beteiligter Carotinoide mit Lorentzanpassung bestimmt. Im Rahmen der Genauigkeit der Lorentzanpassung (Abb. 11.5) bleibt die Lage der  $\nu_2$  Bande bei  $1158,8\text{ cm}^{-1}$  weitestgehend gleich, was in Übereinstimmung mit den von Ruban *et. al.* publizierten Ergebnissen ist<sup>12</sup>.



**Abbildung 11.5:** Mit Lorentz-anpassung bestimmte Position der  $v_1$  (oben) und  $v_2$  (unten) Banden sämtlicher in den Algenzellen enthaltenen Carotinoide im zeitlichen Verlauf von 10354 Raman-spektren aus 16 Hell-Dunkel-Zyklen. Kleine Pfeile kennzeichnen die Hellphasen. Während die Lage der  $v_2$  Bande bei  $1158,8 \text{ cm}^{-1}$  weitestgehend gleich bleibt, beschreibt die  $v_1$  Bande eine den Hell-Dunkel-Zyklen folgende periodische Verschiebung von  $1 \text{ cm}^{-1}$  zwischen  $1526 \text{ cm}^{-1}$  und  $1527 \text{ cm}^{-1}$ .



**Abbildung 11.6:** Reaktion des Violaxanthinzyklus auf Hell-Dunkel-Übergänge. Die Zeitkonstanten in Minuten wurden durch Anpassen von Exponentialfunktionen an die Violaxanthinkonzentration (grün) bestimmt und ergeben im Mittel  $46 \pm 4$  Minuten. Die Zeaxanthinkonzentration (türkis) zeigt schwach einen dazu komplementären Verlauf. Zwei weitere Komponenten (rot und blau) repräsentieren Chlorophylle und weitere Carotinoide, die nicht direkt am Violaxanthinzyklus beteiligt sind.

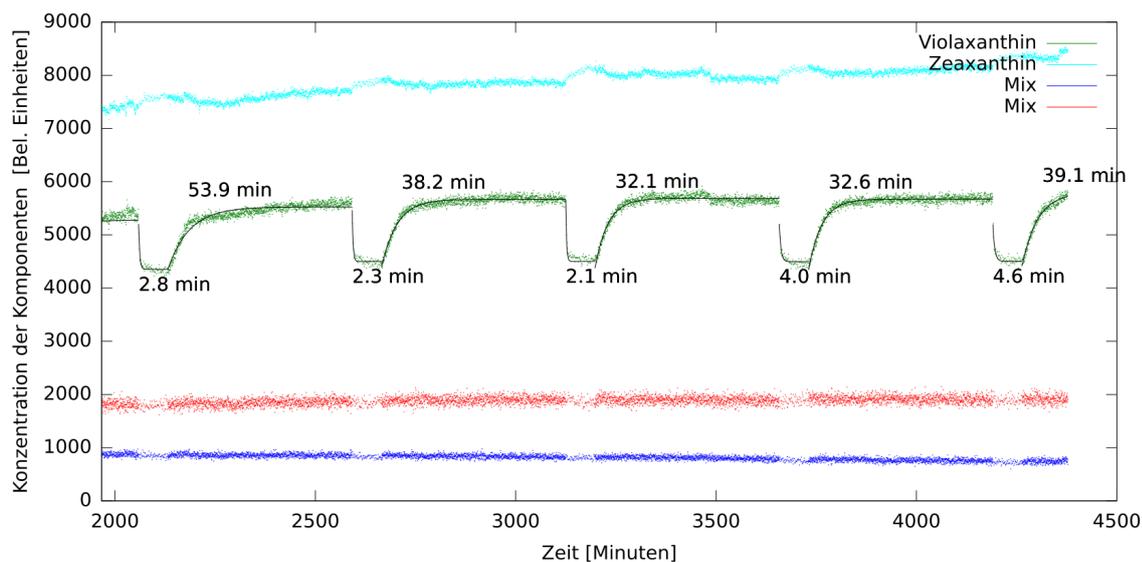
Die periodische Verschiebung der  $\nu_1$  Bande zwischen  $1526\text{ cm}^{-1}$  und  $1527\text{ cm}^{-1}$  liegt innerhalb der publizierten Positionen für isoliertes Zeaxanthin ( $1522\text{ cm}^{-1}$ ) und isoliertes Violaxanthin ( $1529\text{ cm}^{-1}$ ) in Pyridin<sup>12</sup>. Eine Verschiebung der  $\nu_1$  Bande um  $1\text{ cm}^{-1}$  konnte an lebenden Algenzellen bestimmt werden (Abb. 11.5), während für isolierte Thylakoidmembranen eine Verschiebung von bis zu  $3\text{ cm}^{-1}$  möglich ist<sup>12</sup>. Dies ist wahrscheinlich auf eine unvollständige Umwandlung von Violaxanthin in Zeaxanthin in lebenden Zellen zurückzuführen. Das für diese Messung verwendete Gitter mit 2400 Linien/mm erreichte eine Auflösung von  $0,3\text{ cm}^{-1}$  pro Pixel.

Die Zeitkonstante der Hell-Dunkel-Anpassung wurde nach Hauptkomponentenzerlegung des Datensatzes durch die Anpassung von Exponentialfunktionen an die einzelnen Hell-Dunkel-Zyklen der Violaxanthinkonzentration im Verlauf von 14 Zyklen bestimmt (Abb. 11.6) und beträgt im Mittel  $46 \pm 4$  Minuten. Die Zeaxanthinkonzentration zeigt einen zur Violaxanthinkonzentration komplementären Verlauf, das geringe Signal-zu-Rausch-Verhältnis resultiert aus einer nichtresonanten Anregung des Zeaxanthins, welche durch eine andere, näher am 0-0 Übergang des Zeaxanthins liegende Anregungswellenlänge verbessert werden könnte. Zwei weitere Komponenten repräsentieren Chlorophylle und weitere Carotinoide, die nicht direkt am Violaxanthinzyklus beteiligt sind. Ein anders geformter zeitlicher Verlauf ist in den ersten beiden Zyklen zu erkennen, der aus der Justage des Experimentes und dem plötzlichen Wechsel der Kulturbedingungen von schwachem Dauerlicht im Anzuchtreaktor hin zur periodischen Stressbeleuchtung unter ständigem Rühren resultiert. Diese beiden Zyklen wurden deshalb nicht zur Bestimmung der Zeitkonstanten herangezogen.

## 11.4 Kinetik der Dunkel-Hell-Adaption

Zur Untersuchung des Dunkel-Hell-Überganges (Abb. 11.7) wurde ein Zyklus bestehend aus 73 Minuten roter Stressbeleuchtung sowie 459 Minuten darauf folgender Dunkelheit verwendet. Jeweils nach 42 Sekunden wurde die Stressbeleuchtung für 21 Sekunden unterbrochen, um ein ungestörtes Ramanspektrum aufzunehmen. In Anbetracht der im vorherigen Abschnitt 11.3 zu  $46 \pm 4$  Minuten bestimmten Zeitkonstante für den Hell-Dunkel-Übergang kann der Effekt der kurzen Unterbrechungen auf den Zustand des Violaxanthinzyklus vernachlässigt werden. Insgesamt ergab sich so für jeden Zyklus eine Bestrahlungsdauer von 49 Minuten. Die Aufnahme von Daten begann nach drei vollständigen Hell-Dunkel-Zyklen, um den Algen Gelegenheit zu geben, sich an die veränderten Kulturbedingungen zu gewöhnen.

Mit diesem Experiment konnte die mittlere Zeitkonstante des Dunkel-Hell-Überganges durch Anpassung von Exponentialfunktionen an die Violaxanthinkonzentration zu  $3,2 \pm 1,0$  Minuten bestimmt werden. Für den Hell-Dunkel-Übergang ergab sich eine mittlere



**Abbildung 11.7:** Reaktion des Violaxanthinzyklus auf Hell-Dunkel-Übergänge (oberhalb, im Mittel  $39 \pm 8$  Minuten) und Dunkel-Hell-Übergänge (unterhalb, im Mittel  $3,2 \pm 1,0$  Minuten), durch Anpassung von Exponentialfunktionen an den zeitlichen Verlauf der Violaxanthinkonzentration (grün) bestimmt. Die Zeaxanthinkonzentration zeigt schwach einen dazu komplementären zeitlichen Verlauf. Zwei weitere Komponenten (rot und blau) repräsentieren Chlorophylle und weitere Carotinoide, die nicht direkt am Violaxanthinzyklus beteiligt sind.

Zeitkonstante von  $39 \pm 8$  Minuten. Die Zeaxanthinkonzentration zeigt einen zur Violaxanthinkonzentration komplementären zeitlichen Verlauf, allerdings auf Grund nichtresonanter Anregung mit einem geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnis (vgl. Abb. 11.6). Die mittleren Zeitkonstanten sind mit den von Jahns an Erbsenpflanzen *Pisum sativum*<sup>6</sup> sowie von Latowski *et. al.* an der Dreifurchigen Wasserlinse *Lemna trisulca*<sup>7</sup> mit Flüssigchromatographie (HPLC) bestimmten Kinetiken vergleichbar.

Die für den Hell-Dunkel-Übergang ermittelte Zeitkonstante von  $39 \pm 8$  Minuten ist infolge der veränderten Belichtungsbedingungen etwas kürzer als die im vorherigen Experiment bestimmten  $46 \pm 4$  Minuten (siehe 11.3). Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung von Jahns und Miehe, dass die Kinetik des Hell-Dunkel-Überganges teilweise von der verwendeten Beleuchtungsintensität abhängt<sup>30</sup>.

## 11.5 Zusammenfassung

In diesem Abschnitt ist die erste direkte *in vivo* Messung der Kinetik des Violaxanthinzyklus an *Dunaliella salina* beschrieben. Die Zeitkonstanten für den Hell-Dunkel-Übergang liegen dabei je nach experimentellen Bedingungen zwischen  $39 \pm 8$  und  $46 \pm 4$  Minuten. Für den Dunkel-Hell-Übergang wurde eine Zeitkonstante von  $3,2 \pm 1,0$  Minuten bestimmt.

Die mit Hauptkomponentenzerlegung bestimmten Linienlagen der  $\nu_1$  Bande von Violaxanthin und Zeaxanthin stimmen innerhalb von  $2\text{ cm}^{-1}$  mit den publizierten Werten für isolierte, in Pyridin gelöste Violaxanthine und Zeaxanthine bei gleicher Anregungswellenlänge überein<sup>12</sup>. Die Kinetiken sind mit den mit destruktiver Probennahme an höheren Pflanzen und anschließender chemischer Analyse mittels Flüssigchromatographie (HPLC) bestimmten und publizierten Reaktionen des Violaxanthinzyklus vergleichbar<sup>6,7</sup>.

Weitere Forschung ist nötig, um den Einfluss von Umweltfaktoren auf die Kinetik des Violaxanthinzyklus zu untersuchen. Insbesondere sollten unterschiedliche zeitliche Beleuchtungszyklen erprobt und mögliche Einflüsse der zur Stressbeleuchtung verwendeten Wellenlängen untersucht werden. Außerdem zeigten die Algen zu Beginn "Übergangsreaktionen" vor dem periodischen Einpendeln der Kinetik, so dass abrupte Wechsel der Beleuchtungszyklen in einem laufenden Experiment Zugang zu weiteren Spezialfällen bieten können.



# Kapitel 12

## Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein Experiment auf Basis von Resonanz-Ramanspektroskopie entwickelt, womit Carotinoide in lebenden Zellen detektiert werden können und der zeitliche Verlauf von Konzentrationsänderungen der Carotinoide in lebenden Algenzellen ermittelt werden kann. Dazu wurden zwei unterschiedliche Ramansysteme aufgebaut, kalibriert und erprobt. Zur Kalibration der Pulsenergien und Steuerung der Experimente kam der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte optimierende Forth-Compiler “Mecrisp-Stellaris” zum Einsatz. Zur Auswertung der Messdaten wurde für die speziellen Anforderungen von *in vivo* Resonanz-Ramanspektroskopie ein neuartiger Grundlinienkorrekturalgorithmus entwickelt, welcher sich in Verbindung mit Hauptkomponentenzerlegung bewährt hat. Auf Basis dieser methodischen Entwicklungen konnte zum ersten Mal direkt und *in vivo* die Kinetik des Violaxanthinzyklus bestimmt werden, welcher eine entscheidende Rolle für die Stresstoleranz von Pflanzen spielt.

Mit den ersten gelungenen ramanspektroskopischen *in vivo* Messungen von Violaxanthinzykluskinetiken an *Dunaliella salina* ist nun die experimentelle Basis gelegt, mit der weitergehende biologische Fragestellungen untersucht werden können. Im Rahmen dieser Dissertation konnten nur einige wenige ausgewählte Algenarten angezogen und untersucht werden, außerdem gibt es neben Wellenlänge, Beleuchtungsintensität und Hell-Dunkel-Rythmus noch viele weitere freie Parameter wie Details der Kulturführung, welche sich generell auf die Stressreaktion von Pflanzen auswirken und deren Einfluss auf den Violaxanthinzyklus noch unbekannt ist. Allein eine Erkundung des riesigen möglichen Parameterraumes dürfte genug Material für weitere Forschung liefern und sowohl die botanische Grundlagenforschung als auch die Pflanzenzüchtung in Hinblick auf den sich verschärfenden Klimawandel voranbringen.

Künftige Experimente können von einem zusätzlichen optischen Filter zwischen der zur Stressbeleuchtung verwendeten Leuchtdiode und der Algenkultur profitieren, um die Aufnahme ungestörter Ramanspektren während der Stressbeleuchtung selbst zu ermöglichen.

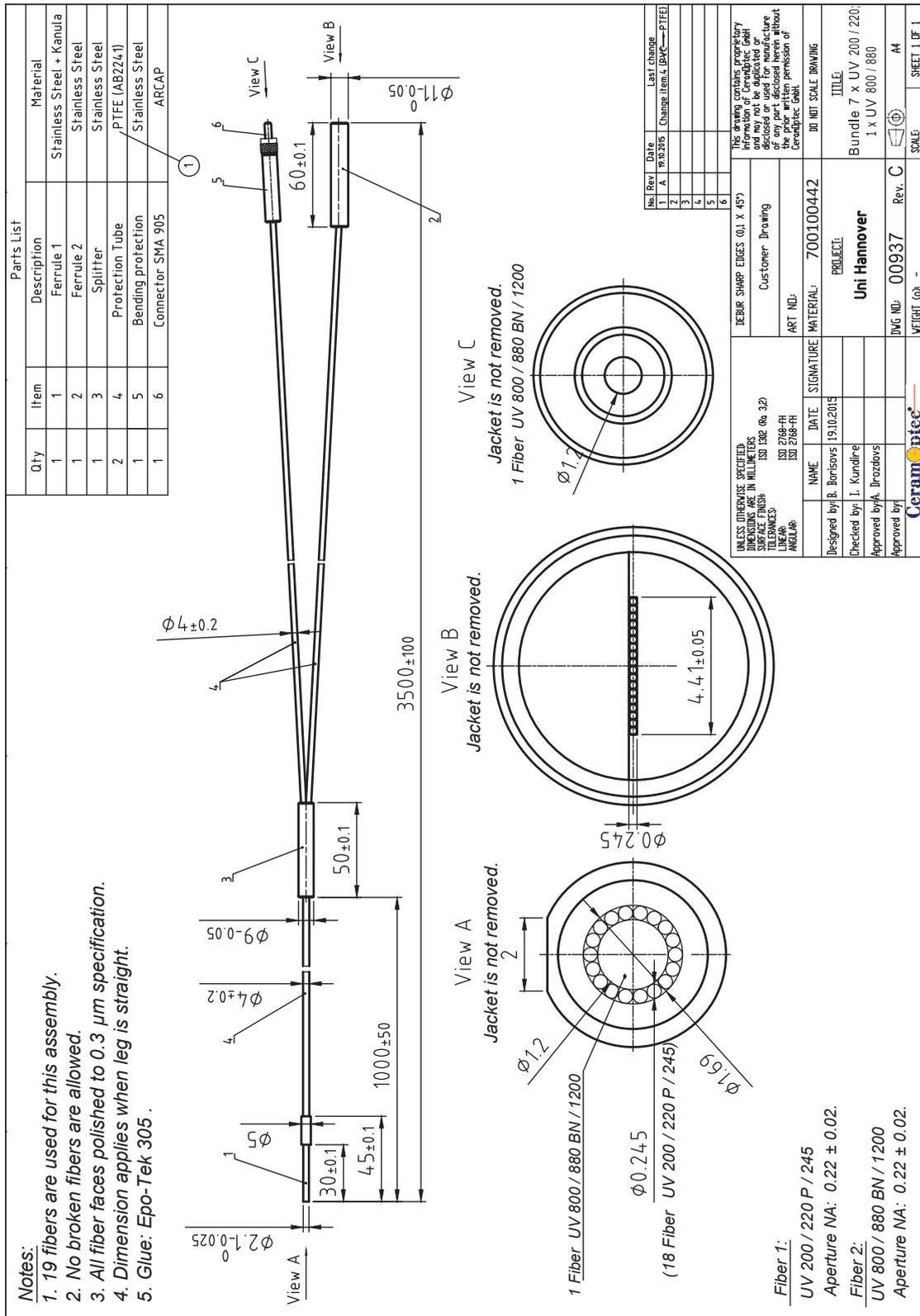
Mit Hilfe einer zusätzlichen, besser zur Anregung des 0-0 Überganges von Zeaxanthin geeigneten Laserwellenlänge, wie beispielsweise der 514,5 nm Linie eines Argon-Ionen-Lasers, ließe sich außerdem das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Zeaxanthin-Ramanlinien verbessern, was eine komplementäre Bestimmung der Kinetik anhand der Zeaxanthinkonzentration ermöglicht.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden außerdem Resonanzkarten und Resonanzprofile der drei Algenarten *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis* und *Porphyridium purpureum* in verschiedenen Stresszuständen aufgenommen. Die Synthese des sekundären Carotinoids Astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* konnte anhand einer Rotverschiebung der Resonanzmaxima der Carotinoidlinien verfolgt werden.

Weitere Verfeinerungen können Gegenstand zukünftiger Forschung sein: Derzeit sind die Anregungsintensitäten für die Ramanspektroskopie so groß, dass die Kinetikbestimmung des Violaxanthinzyklus nur an kontinuierlich gerührten Mikroalgenkulturen durchgeführt werden konnte, um Lichtstress durch den für die Messung nötigen Laserstrahl selbst zu vermeiden. Ramanspektroskopie mit geringen Intensitäten ist und bleibt eine apparative Herausforderung, zu deren Lösung auch das Verteilen der Anregungsintensität auf eine größere Fläche ins Auge gefasst werden kann. Erst wenn diese Herausforderung gelöst ist, kann mit Untersuchungen an Landpflanzen begonnen werden.

Die Messung von Resonanzkarten mit einem durchstimmbaren Laser kann in Zukunft ebenso noch weiter ausgebaut werden, vor allem durch eine Verbesserung der spektralen Kalibration bei schnell wechselnden Gitterlagen, so dass eine präzise Linienlagenbestimmung ermöglicht wird und damit eine partiell selektive Anregung verschiedener Carotinoidpopulationen in den Algenzellen experimentell zugänglich wird. Für die Beobachtung von Violaxanthinzykluskinetiken selbst haben sich Resonanzkarten vor allem auf Grund ihrer prinzipiell bedingt langen Messdauer als ungeeignet erwiesen, jedoch eröffnen sich andere Anwendungen, insbesondere im Umfeld der Pigmentproduktion in Algenkulturen.

# **Anhang A**



**Abbildung A.1:** Konstruktionszeichnung des Faserbündels, von CeramOptec (Bonn, Deutschland) im Auftrag angefertigt.



### 1. Basal Medium (= ES "Erddekot + Salze")

	stock solution [g/100 ml]	nutrient solution [ml]
KNO <sub>3</sub>	1	20
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1	20
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1	20
soil extract *		30
micronutrient solution **		5
de-ionized or distilled water		905

\* Preparation of soil extract: Fill a 6 litre flask one third with garden or leaf soil of medium, but not too great humus content which does not contain fertilizers or plant protective agents. Success of soil extract depends on selection of suitable soils. Those with high clay content are usually less satisfactory. Add de-ionized water until it stands 5 cm above the soil and sterilize by heating in a steamer for one hour twice in a 24 h interval. Separate the decanted extract from particles by centrifugation. Fill into small containers of stock solution each of a size appropriate to making a batch of media, autoclave for 20 min at 121°C and store in the refrigerator.

#### \*\* Preparation of the micronutrient solution:

	stock solution [g/100 ml]	applied solution
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1	1 ml
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.1	2 ml
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.2	5 ml
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.02	5 ml
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.02	5 ml
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.0005	1 ml
de-ionized or distilled water		981 ml
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		0.7 g
EDTA (Titriplex III, Merck)		0.8 g

Autoclave the components separately in two solutions which are united after cooling.

**Solution I:** 881 ml distilled water + stock solutions of salts without FeSO<sub>4</sub> + 0.4 g EDTA

**Solution II:** 100 ml distilled water + 0.7 g FeSO<sub>4</sub> + 0.4 g EDTA

The following modifications of the Basal Medium proved suitable for many strains:

**a) Basal Medium with Beef Extract (= ESFL "Erddekot + Salze + Fleisch"):** Basal Medium (Medium 1) with 0.1 % beef extract.

**b) Basal Medium with Peptone (= ESP "Erddekot + Salze + Peptone"):**

Basal Medium (Medium 1) with 0.1% proteose-peptone.

**c) Basal Medium with 10 % Euglena Medium and Vitamins (= +V "Erddekot + Salze + Euglena gracilis Medium + Vitamine"):**

Basal Medium (Medium 1) plus 10 % Euglena Medium (medium 9) and the vitamins B<sub>1</sub> (5 x 10<sup>-4</sup> g/l) and B<sub>12</sub> (5 x 10<sup>-6</sup> g/l), added in sterile solution after autoclaving.

**d) Acidified Basal Medium (= ES + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>):**

Basal Medium (Medium 1) plus 1% conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

www.epsag.uni-goettingen.de

**Abbildung A.2:** Rezept für ES-Medium der Göttinger Sammlung von Algenkulturen, unverändert aus<sup>84</sup> entnommen.



#### **14. Dunaliella Medium (= Dun.)**

	stock solution	nutrient solution
	[g/100 ml]	[ml]
KNO <sub>3</sub>	1	20
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1	20
soil extract *	30	
artificial seawater **	930	

**\* Preparation of soil extract (as in medium 1):**

Fill a 6 litre flask one third with garden or leaf soil of medium, but not too great humus content which does not contain fertilizers or plant protective agents. Success of soil extract depends on selection of suitable soils. Those with high clay content are usually less satisfactory. Add de-ionized water until it stands 5 cm above the soil and sterilize by heating in a steamer for one hour twice in a 24 h interval. Separate the decanted extract from particles by centrifugation. Fill into small containers of stock solution each of a size appropriate to making a batch of media, autoclave for 20 min at 121 deg; C and store in the refrigerator.

**\*\* Preparation of artificial seawater:**

Dissolve in 1000 ml of de-ionized or distilled water 60.0 g NaCl, 10.0 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.5 g KCl, and 2.0 g CaSO<sub>4</sub>.

# Literaturverzeichnis

1. Frank, H. A. *u. a.* Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis. *Photosyn. Res.* **41**, 389 (1994).
2. Krause, G. H. & Weis, E. Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42** (1991).
3. Maxwell, K. & Johnson, G. N. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. Exp. Bot.* **51**, 659 (2000).
4. Zarco-Tejada, P. J. *u. a.* Imaging chlorophyll fluorescence with an airborne narrow-band multispectral camera for vegetation stress detection. *Remote Sens. Environ.* **113**, 1262 (2009).
5. Bowmaker, J. K. & Dartnall, H. J. Visual pigments of rods and cones in a human retina. *J. Physiol.* **298**, 501 (1980).
6. Jahns, P. The Xanthophyll Cycle in Intermittent Light-Grown Pea Plants: Possible Functions of Chlorophyll a/b-Binding Proteins. *J. Plant Physiol.* **108**, 149 (1995).
7. Latowski, D., Kostecka-Gugała, A. & Strzałka, K. Effect of the Temperature on Violaxanthin De-Epoxidation: Comparison of the In Vivo and Model Systems. *Russ. J. Plant Physiol.* **50**, 173 (2003).
8. Han, H. *u. a.* Overexpression of violaxanthin de-epoxidase gene alleviates photo-inhibition of PSII and PSI in tomato during high light and chilling stress. *J. Plant Physiol.* **167**, 176 (2010).
9. McCree, K. J. & Loomis, R. S. Photosynthesis in Fluctuating Light. *Ecology* **50**, 422 (1969).
10. Long, D. A. *The Raman Effect - A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules* (Wiley, 2001).
11. *Carotenoids Volume 1B: Spectroscopy* (Hrsg. Britton, G., Liaaen-Jensen, S. & Pfander, H.) (Birkhäuser, 1995).
12. Ruban, A. V., Pascal, A. A., Robert, B. & Horton, P. Configuration and dynamics of xanthophylls in light-harvesting antennae of higher plants: Spectroscopic analysis of isolated light-harvesting complex of photosystem II and thylakoid membranes. *J. Biol. Chem.* **276**, 24862 (2001).

13. Kathiresan, S., Sarada, R., Bhattacharya, S. & Ravishankar, G. Culture media optimization for growth and phycoerythrin production from *Porphyridium purpureum*. *Biotechnol. Bioeng.* **96**, 456 (2007).
14. Oren, A. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline Syst.* **1**, 2 (2005).
15. Collins, A. M. *u. a.* Carotenoid Distribution in Living Cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *PLOS ONE* **6**, 1 (Sep. 2011).
16. Adams, W. W. & Demmig-Adams, B. Operation of the xanthophyll cycle in higher plants in response to diurnal changes in incident sunlight. *Planta* **186**, 390 (1992).
17. Garcia-Plazaola, J., Faria, T., Abadia, J., Chaves, M. & Pereira, J. Seasonal changes in xanthophyll composition and photosynthesis of cork oak (*Quercus suber* L.) leaves under mediterranean climate. *J. Exp. Bot.* **48**, 1667 (1997).
18. Adams III, W. W., Demmig-Adams, B., Logan, B. A., Barker, D. H. & Osmond, C. B. Rapid changes in xanthophyll cycle-dependent energy dissipation and photosystem II efficiency in two vines, *Stephania japonica* and *Smilax australis*, growing in the understory of an open Eucalyptus forest. *Plant Cell Environ.* **22**, 125 (1999).
19. Escalona, J. M., Flexas, J. & Medrano, H. Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis under water stress in field-grown grapevines. *Funct. Plant Biol.* **27**, 421 (2000).
20. Ying, K., Gilmour, J. & Zimmerman, W. B. Effects of CO<sub>2</sub> and pH on growth of the microalga *Dunaliella salina*. *J. Microb. Biochem. Technol.* **2014**, 167 (2014).
21. Dymova, O. & Golovko, T. Seasonal changes of violaxanthin cycle pigment de-epoxidation in wintergreen and evergreen plants. *Acta Biochim. Pol.* **59**, 143 (2012).
22. Hughes, N. M., Burkey, K. O., Cavender-Bares, J. & Smith, W. K. Xanthophyll cycle pigment and antioxidant profiles of winter-red (anthocyanic) and winter-green (acyanic) angiosperm evergreen species. *J. Exp. Bot.* **63**, 1895 (2012).
23. McClung, C. R. Plant Circadian Rhythms. *Plant Cell* **18**, 792 (2006).
24. Amador-Vargas, S. *u. a.* Leaf-folding response of a sensitive plant shows context-dependent behavioral plasticity. *Plant Ecol.* **215**, 1445 (2014).
25. Ruban, A. V. & Horton, P. The Xanthophyll Cycle Modulates the Kinetics of Non-photochemical Energy Dissipation in Isolated Light-Harvesting Complexes, Intact Chloroplasts, and Leaves of Spinach. *J. Plant Physiol.* **119**, 531 (1999).
26. Masojídek, J. *u. a.* Changes in chlorophyll fluorescence quenching and pigment composition in the green alga *Chlorococcum* sp. grown under nitrogen deficiency and salinity stress. *J. Appl. Phycol.* **12**, 417 (2000).

27. Chaerle, L., Leinonen, I., Jones, H. G. & Van Der Straeten, D. Monitoring and screening plant populations with combined thermal and chlorophyll fluorescence imaging. *J. Exp. Bot.* **58**, 773 (2007).
28. Nichelmann, L., Schulze, M., Herppich, W. B. & Bilger, W. A simple indicator for non-destructive estimation of the violaxanthin cycle pigment content in leaves. *Photosyn. Res.* **128**, 183 (2016).
29. Polívka, T., Herek, J. L., Zigmantas, D., Åkerlund, H.-E. & Sundström, V. Direct observation of the (forbidden) S1 state in carotenoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 4914 (1999).
30. Jahns, P. & Miede, B. Kinetic correlation of recovery from photoinhibition and zeaxanthin epoxidation. *Planta* **198**, 202 (1996).
31. Kleinegris, D. M. M., van Es, M. A., Janssen, M., Brandenburg, W. A. & Wijffels, R. H. Carotenoid fluorescence in *Dunaliella salina*. *J. Appl. Phycol.* **22**, 645 (2010).
32. Rivera, S. & Canela-Garayoa, R. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. *J. Chrom. A* **1224**, 1 (2012).
33. Farber, A., Young, A. J., Ruban, A. V., Horton, P. & Jahns, P. Dynamics of Xanthophyll-Cycle Activity in Different Antenna Subcomplexes in the Photosynthetic Membranes of Higher Plants (The Relationship between Zeaxanthin Conversion and Nonphotochemical Fluorescence Quenching). *J. Plant Physiol.* **115**, 1609 (1997).
34. Bilger, W., Björkman, O. & Thayer, S. S. Light-Induced Spectral Absorbance Changes in Relation to Photosynthesis and the Epoxidation State of Xanthophyll Cycle Components in Cotton Leaves. *J. Plant Physiol.* **91**, 542–551 (1989).
35. Jehlička, J., Edwards, H. G. M. & Oren, A. Raman Spectroscopy of Microbial Pigments. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 3286 (2014).
36. Gruszecki, W. I. *u. a.* Light-induced Change of Configuration of the LHCII-Bound Xanthophyll (Tentatively Assigned to Violaxanthin): A Resonance Raman Study. *J. Phys. Chem.* **113**, 2506 (2009).
37. Ruban, A. V., Pascal, A., Lee, P. J., Robert, B. & Horton, P. Molecular Configuration of Xanthophyll Cycle Carotenoids in Photosystem II Antenna Complexes. *J. Biol. Chem.* **277**, 42937 (2002).
38. Andreeva, A. & Velitchkova, M. Resonance Raman Studies of Carotenoid Molecules Within Photosystem I Particles. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **23**, 488 (2009).
39. Priyadarshani, I. & Rath, B. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. *J. Algal Biomass Utiln.* **3**, 89 (2012).
40. Painter, T. H. *u. a.* Detection and Quantification of Snow Algae with an Airborne Imaging Spectrometer. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5267 (2001).

41. Gitelson, A. A., Laorawat, S., Keydan, G. P. & Vonshak, A. Optical properties of dense algal cultures outdoors and their application to remote estimation of biomass and pigment concentration in *Spirulina platensis* (cyanobacteria). *J. Phycol.* **31**, 828–834 (1995).
42. Takaichi, S. Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. *Mar. Drugs* **9**, 1101 (2011).
43. Kessler, W. *Multivariate Datenanalyse: für die Pharma, Bio- und Prozessanalytik* (Wiley, 2006).
44. Meinhardt-Wollweber, M. *Optoacoustic Characterization of Optical Properties of Human Skin in Vivo in the Ultraviolet Wavelength Range* Diss. (Leibniz Universität Hannover, 2006).
45. Krebs, R. *Entwicklung eines optoakustischen Verfahrens zur Bestimmung der optischen Eigenschaften von menschlicher Haut in vivo mittels eines probabilistischen Ansatzes nach Bayes* Diss. (Leibniz Universität Hannover, 2010).
46. Rather, E. D., Colburn, D. R. & Moore, C. H. The Evolution of Forth. *SIGPLAN Not.* **28**, 177 (1993).
47. Koch, M. *Sonderheft ARM* Deutsche Forth-Gesellschaft. (2015).
48. Hoffmann, U. & Read, A. *A synchronous FORTH framework for hard real-time control* EuroForth proceedings. 2016.
49. Koch, M., Suhr, C., Roth, B. & Meinhardt-Wollweber, M. Iterative morphological and mollifier-based baseline correction for Raman spectra. *J. Raman Spectrosc.* **48**, 336 (2017).
50. Shreve, A. P., Cherepy, N. J. & Mathies, R. A. Effective Rejection of Fluorescence Interference in Raman Spectroscopy Using a Shifted Excitation Difference Technique. *Appl. Spectrosc.* **46**, 707 (1992).
51. Sowoidnich, K. & Kronfeldt, H.-D. Fluorescence rejection by shifted excitation Raman difference spectroscopy at multiple wavelengths for the investigation of biological samples. *ISRN Spectrosc.* **2012** (2012).
52. Matousek, P., Towrie, M. & Parker, A. W. Fluorescence background suppression in Raman spectroscopy using combined Kerr gated and shifted excitation Raman difference techniques. *J. Raman Spectrosc.* **33**, 238 (2002).
53. Ermakov, I. V., Ermakova, M. R., McClane, R. W. & Gellermann, W. Resonance Raman detection of carotenoid antioxidants in living human tissues. *Opt. Lett.* **26**, 1179 (2001).
54. Darwin, M., Brandt, N. & Lademann, J. Photobleaching as a method of increasing the accuracy in measuring carotenoid concentration in human skin by Raman spectroscopy. *Opt. Spectrosc.* **109**, 205 (2010).

55. Golcuk, K. *u. a.* Is photobleaching necessary for Raman imaging of bone tissue using a green laser? *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 868 (2006).
56. Harris, J. M., Chrisman, R. W., Lytle, F. E. & Tobias, R. S. Sub-nanosecond time-resolved rejection of fluorescence from Raman spectra. *Anal. Chem.* **48**, 1937 (1976).
57. Matousek, P. *u. a.* Fluorescence suppression in resonance Raman spectroscopy using a high-performance picosecond Kerr gate. *J. Raman Spectrosc.* **32**, 983 (2001).
58. Schulze, G. *u. a.* Investigation of Selected Baseline Removal Techniques as Candidates for Automated Implementation. *Appl. Spectrosc.* **59**, 545 (2005).
59. Lieber, C. A. & Mahadevan-Jansen, A. Automated Method for Subtraction of Fluorescence from Biological Raman Spectra. *Appl. Spectrosc.* **57**, 1363 (2003).
60. Zhao, J., Lui, H., McLean, D. I. & Zeng, H. Automated Autofluorescence Background Subtraction Algorithm for Biomedical Raman Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **61**, 1225 (2007).
61. Cao, A. *u. a.* A robust method for automated background subtraction of tissue fluorescence. *J. Raman Spectrosc.* **38**, 1199 (2007).
62. Chen, K., Wei, H., Zhang, H., Wu, T. & Li, Y. A Raman peak recognition method based automated fluorescence subtraction algorithm for retrieval of Raman spectra of highly fluorescent samples. *Anal. Methods* **7**, 2770 (6 2015).
63. Schulze, H. G., Foist, R. B., Okuda, K., Ivanov, A. & Turner, R. F. B. A Model-Free, Fully Automated Baseline-Removal Method for Raman Spectra. *Appl. Spectrosc.* **65**, 75 (2011).
64. Zhang, Z.-M. *u. a.* An intelligent background-correction algorithm for highly fluorescent samples in Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **41**, 659 (2010).
65. Perez-Pueyo, R., Soneira, M. J. & Ruiz-Moreno, S. Morphology-Based Automated Baseline Removal for Raman Spectra of Artistic Pigments. *Appl. Spectrosc.* **64**, 595 (2010).
66. Bukvic, S. & Spasojevic, D. An alternative approach to spectrum base line estimation. *Spectrochim. Acta B* **60**, 1308 (2005).
67. De Gussem, K., De Gelder, J., Vandenabeele, P. & Moens, L. The Biodata toolbox for MATLAB. *Chemometr. Intell. Lab.* **95**, 49 (2009).
68. Meinhardt-Wollweber, M., Suhr, C., Kniggendorf, A.-K. & Roth, B. Tissue phantoms for multimodal approaches: Raman spectroscopy and optoacoustics. *Proc. SPIE* **8945**, 89450B (2014).
69. Jahns, P., Latowski, D. & Strzalka, K. Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: The role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* **1787**, 3 (2009).

70. Gouveia, L. *u. a.* Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*. *Biore-sour. Technol.* **57**, 157–163 (1996).
71. Feng, Y., Li, C. & Zhang, D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. *Bioresour. Technol.* **102**. Special Issue: Biofuels - II: Algal Biofuels and Microbial Fuel Cells, 101–105 (2011).
72. Khalili, A., Najafpour, G. D., Amini, G. & Samkhaniyani, F. Influence of nutrients and LED light intensities on biomass production of microalgae *Chlorella vulgaris*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **20**, 284 (2015).
73. Mühlroth, A. *u. a.* Pathways of Lipid Metabolism in Marine Algae, Co-Expression Network, Bottlenecks and Candidate Genes for Enhanced Production of EPA and DHA in Species of Chromista. *Mar. Drugs* **11**, 4662 (2013).
74. Paniagua-Michel, J., Olmos-Soto, J. & Ruiz, M. A. in *Microbial Carotenoids from Bacteria and Microalgae: Methods and Protocols* (Hrsg. Barredo, J.-L.) 1 (Humana Press, Totowa, NJ, 2012).
75. Přibyl, P., Cepák, V. & Zachleder, V. Production of lipids and formation and mobilization of lipid bodies in *Chlorella vulgaris*. *J. Appl. Phycol.* **25**, 545 (2013).
76. Czamara, K. *u. a.* Raman spectroscopy of lipids: a review. *J. Raman Spectrosc.* **46**, 4 (2015).
77. Boussiba, S., Bing, W., Yuan, J.-P., Zarka, A. & Chen, F. Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnol. Lett.* **21**, 601 (1999).
78. Holzinger, A. & Karsten, U. Desiccation stress and tolerance in green algae: consequences for ultrastructure, physiological and molecular mechanisms. *Front. Plant Sci.* **4**, 327 (2013).
79. Kobayashi, M., Kurimura, Y. & Tsuji, Y. Light-independent, astaxanthin production by the green microalga *Haematococcus pluvialis* under salt stress. *Biotechnol. Lett.* **19**, 507 (1997).
80. Gu, W. *u. a.* Comparison of Different Cells of *Haematococcus pluvialis* Reveals an Extensive Acclimation Mechanism during its Aging Process: From a Perspective of Photosynthesis. *PLOS ONE* **8**, 1 (2013).
81. Chen, H. & Jiang, J.-G. Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. *J. Cell. Physiol.* **219**, 251 (2009).
82. Ley, A. C. & Butler, W. L. Effects of Chromatic Adaptation on the Photochemical Apparatus of Photosynthesis in *Porphyridium cruentum*. *Plant Physiol.* **65**, 714 (1980).
83. Marquardt, J. & Rehm, A. M. *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta) from red and green light: characterization of photosystem I and determination of in situ fluorescence spectra of the photosystems. *J. Photochem. Photobiol. B* **30**, 49 (1995).

84. *Basal Medium Recipe* (www.epsag.uni-goettingen.de, 2007).
85. *Dunaliella Medium Recipe* (www.epsag.uni-goettingen.de, 2008).
86. Singh, R. & Sharma, S. Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **16**, 2347 (2012).
87. Terpstra, P., Combes, D. & Zwick, A. Effect of salts on dynamics of water: A Raman spectroscopy study. *J. Chem. Phys.* **92**, 65 (1990).
88. Saito, S., Tasumi, M. & Eugster, C. H. Resonance Raman spectra (5800–40 1/cm) of All-trans and 15-cis isomers of  $\beta$ -carotene in the solid state and in solution. Measurements with various laser lines from ultraviolet to red. *J. Raman Spectrosc.* **14**, 299 (1983).
89. Rimai, L., Kilponen, R. G. & Gill, D. Excitation profiles of laser Raman spectra in the resonance region of two carotenoid pigments in solution. *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 3824 (1970).
90. Gruszecki, W. I. u. a. Light-induced change of configuration of the LHCII-bound xanthophyll (tentatively assigned to violaxanthin): a resonance Raman study. *J. Phys. Chem. B* **113**, 2506 (2009).
91. Koch, M., Kniggendorf, A.-K., Meinhardt-Wollweber, M. & Roth, B. In vivo determination of carotenoid resonance excitation profiles of *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, and *Porphyridium purpureum*. *J. Raman Spectrosc.* **49**, 404 (2018).
92. Algarra, P. & Rüdiger, W. Acclimation processes in the light harvesting complex of the red alga *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross, according to irradiance and nutrient availability. *Plant Cell Environ.* **16**, 149 (1988).
93. Seepratomrosh, J. u. a. The Effect of Light Stress and Other Culture Conditions on Photoinhibition and Growth of *Dunaliella tertiolecta*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **178**, 396 (2016).
94. Koch, M., Zagermann, S., Kniggendorf, A.-K., Meinhardt-Wollweber, M. & Roth, B. Violaxanthin cycle kinetics analysed in vivo with resonance Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **48**, 686 (2017).
95. Hager, A. Untersuchungen über die lichtinduzierten reversiblen Xanthophyllumwandlungen an *Chlorella* und *Spinacia*. *Planta* **74**, 148 (1967).
96. Salares, V. R., Mendelsohn, R., Carey, P. R. & Bernstein, H. J. Correlation between the absorption spectra and resonance Raman excitation profiles of astaxanthin. *J. Phys. Chem.* **80**, 1137 (1976).
97. Ermakov, I. V., Sharifzadeh, M., Ermakova, M. & Gellermann, W. Resonance Raman detection of carotenoid antioxidants in living human tissue. *J. Biomed. Opt.* **10** (2005).

98. Devred, E. *u. a.* Future Retrievals of Water Column Bio-Optical Properties using the Hyperspectral Infrared Imager (HyspIRI). *Remote Sens.* **5**, 6812–6837 (2013).
99. Vitek, P. *u. a.* Microbial colonization of halite from the hyper-arid Atacama Desert studied by Raman spectroscopy. *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.* **368**, 3205 (2010).
100. Gantt, E. Phycobilisomes: Light-Harvesting Pigment Complexes. *Bioscience* **25**, 781 (1975).
101. Marquardt, J. & Ried, A. Fractionation of thylakoid membranes from *Porphyridium purpureum* using the detergent N-lauryl- $\beta$ -iminodipropionate. *Planta* **187**, 372 (1992).

# Lebenslauf

Name	Matthias Karl Ernst Koch
Geburtstag	4. Dezember 1985
Geburtsort	Walsrode
Schulische Laufbahn	1992-1996 Grundschule Bothmer 1996-1998 Orientierungsstufe Schwarmstedt 1998-2002 Wilhelm-Röpke-Schule Schwarmstedt, Realschule 2002-2005 Gymnasium Walsrode
Universitäre Laufbahn	2005-2010 Physikstudium an der Leibniz Universität Hannover 2010-2018 Promotion an der Leibniz Universität Hannover  1.4.2010 - 31.8.2010 Wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Biologische Produktionssysteme 15.3.2011 - 31.12.2012 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie 1.1.2016 - 31.3.2016 Wissenschaftliche Hilfskraft im Hannoverschen Zentrum für Optische Technologien 1.5.2016 - 31.10.2016 Wissenschaftliche Hilfskraft im Hannoverschen Zentrum für Optische Technologien 1.11.2016 - 31.12.2016 Wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Biophysik 1.9.2017 - 31.12.2017 Wissenschaftliche Hilfskraft im Hannoverschen Zentrum für Optische Technologien
Universitätsabschluss	Diplom in Physik



# Publikationen

Teile dieser vorliegenden Dissertation wurden bereits in ähnlicher Form in meiner Diplomarbeit zum Thema “Resonanz-Ramanspektroskopie an Carotinoiden” sowie in meinen drei Publikationen “Iterative morphological and mollifier-based baseline correction for Raman spectra”<sup>49</sup>, “Violaxanthin cycle kinetics analysed *in vivo* with resonance Raman spectroscopy”<sup>94</sup> und “In vivo determination of carotenoid resonance excitation profiles of *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, and *Porphyridium purpureum*”<sup>91</sup> im Journal of Raman Spectroscopy veröffentlicht. Der im Rahmen dieser Arbeit entstandene und in den Experimenten verwendete optimierende Forth-Compiler “Mecrisp-Stellaris” wurde von mir ausführlich in dem von der Deutschen Forth-Gesellschaft herausgegebenen “Sonderheft ARM”<sup>47</sup> beschrieben.



# Danksagung

1. Gutachter Prof. Dr. Bernhard Roth  
2. Gutachter Prof. Dr. Uwe Morgner  
Fachliche Betreuung Dr. Ann-Kathrin Kniggendorf und Dr. Merve Wollweber

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen natürlich die Experimente und die erzielten Ergebnisse, doch zum Gelingen bedurfte es außerdem noch der geduldigen Helferlein im Hintergrund, der Dozenten, die mich die Grundlagen lehrten und der Kolleginnen und Kollegen, die mir mit ihren Gedanken und Erfahrungen zur Seite standen. Von all jenen, die ein Dankeschön verdient haben, möchte ich hier eine kleine Auswahl besonders hervorheben:

- *Ann-Kathrin Kniggendorf* und *Merve Wollweber*, die meine Experimente und Gedankengänge begleiteten und gelegentlich auch sanft gelenkt haben.
- *Bernhard Roth*, der mir sein Labor zur Verfügung stellte und voller Vertrauen meinen ziemlich exotischen Experimenten zugesehen hat.
- *Uwe Morgner*, der zum Glück - wie schon zu meiner Diplomarbeit - mein Zweitprüfer geworden ist.
- *Martin Höhl*, mit dem gemeinsam ich die Hürden launischer Spektrometer und verstimmt Laser nehmen konnte.
- *Serge Zagermann*, welcher mir sein Wissen bei der Kultur der Algen schenkte und bei allen "biologischen Überraschungen" Rat wusste.

Nun wird es Zeit, auch all jenen ein Dankeschön zuzurufen, die auf dem verschlungenen Weg meiner Doktorarbeit eine wesentliche, aber nicht so ganz offensichtliche Rolle gespielt haben. Doch wo fange ich am besten an ? Natürlich, bei der Idee. Die Idee entstand während meiner Diplomarbeit im Institut für Biophysik, wo *Thilo Reeck* mich mit seiner Begeisterung für Algen ansteckte. Und wo *Anaclet Ngezahayo* mit einem Lachen die Disziplinen so zu verbinden wusste, dass es mir ganz natürlich vorkam, Physik und Biologie unter einen Hut zu bringen. Vielen Dank schließlich an all die Menschen, die während der langen, langen Zeit viel Geduld für mich und meine Forschung hatten.

Schade, dass die verstorbene *Angelika Anders von Ahlfen* nie von meiner Doktorarbeit erfahren hat, denn als ich ihr das erste Mal im Fortgeschrittenenpraktikum begegnete und an meine Diplomarbeit dachte, war sie sich bereits sicher, dass ich eines Tages eine Doktorarbeit im Gebiet der Biophysik schreiben würde. Und wie der Leser (oder die Leserin?) es jetzt wohl sieht: Sie hatte Recht.

Matthias Koch